Untersuchungen zum Abbau von Ligninmodellsubstanzen durch **Rhodococcus erythropolis**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Ernst Jaeger
aus Stolberg

1981

1980

Untersuchungen zum Abbau von Ligninmodellsubstanzen durch **Rhodococcus erythropolis**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Ernst Jaeger

aus Stolberg

1980

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. H. Sahm
Korreferent: Prof. Dr. C. Hollenberg
Tag der mündlichen Prüfung: 5. Februar 1981

für meine Mutter
und meinen Vater

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41536504_0019

Die vorliegende Arbeit wurde im Institut für Biotechnologie I der Kernforschungsanlage Jülich GmbH ausgeführt.

Herrn Prof. Dr. Sahm danke ich für die Überlassung des Themas, die großzügige Unterstützung der Arbeit und seine zahlreichen Anregungen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Eggeling für die Betreuung und seine ständige Diskussionsbereitschaft. Danken möchte ich auch Frau Cichorius für ihre technische Mitarbeit, Herrn Prof. Dr. Cain, Herrn Prof. Dr. Higuchi, Herrn Prof. Dr. Kern und Herrn Prof. Dr. Knackmuss für die freundliche Bereitstellung verschiedener chemischer Präparate, Herrn Doz. Dr. Kneifel für die Durchführung der massenspektroskopischen Untersuchungen und allen Mitarbeitern des Instituts für ihre Hilfsbereitschaft.

Abkürzungen

D	Verdünnungsrate (h^{-1})
D_c	kritische Verdünnungsrate (h^{-1})
DEAE-	Diäthylaminoäthyl-
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Äthylendiamintetraacetat
FAD	Flavinadenindinucleotid
ΔE	Extinktionsänderung
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
K_{av}	Elutionskonstante
K_I	Inhibitorkonstante (mM)
K_M	Michaelis-Menten-Konstante (mM)
NAD(H)	β-Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (reduziert)
NADP(H)	β-Nicotinamid-Adenin-Dinucleotidphosphat (reduziert)
μ	Wachstumsrate (h^{-1})
q	Substratumsatzrate (mg/l·h)
Q	spezifische Substratumsatzrate (mg/mg·h)
$\bar{s}$	Substratkonzentration (g/l)
[S]	Substratkonzentration
ΔS	Änderung der Substratkonzentration
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin
Tris	Tris-(hydroxyl)aminomethan
U	Enzymeinheit (Unit)
Upm	Umdrehungen pro Minute
V_o	Säulenleervolumen
V_e	Elutionsvolumen
V_t	Gesamtvolumen
v	Reaktionsgeschwindigkeit
v_o	Anfangsreaktionsgeschwindigkeit
v_{max}	maximale Reaktionsgeschwindigkeit
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
$\bar{x}$	Biomassekonzentration (g/l)
$Y_{\frac{max}{x/s}}$	maximale Zellausbeute (g Trockengewicht/g Substrat)

Inhaltsverzeichnis

I.	Einleitung	3
II.	Material und Methoden	11
1.	Organismen	11
2.	Chemikalien	12
3.	Nährmedien	13
4.	Kulturbedingungen	15
5.	Bestimmung der Wachstumsleistung	16
6.	Mutagenese und Isolierung der Mutanten	17
7.	Herstellung von Rohextrakten	18
8.	Bestimmung der Enzymaktivitäten	18
9.	Ammoniumsulfat-Fällung	24
10.	Polyacrylamidgel-Elektrophorese	25
11.	Aktivitätsfärbung der Coniferylalkohol-Dehydrogenase im Polyacrylamidgel	27
12.	Methoden der Säulenchromatographie	27
13.	Dünnschichtchromatographie	29
14.	Hochdruckflüssigkeitschromatographie	31
15.	Molekulargewichtsbestimmung	34
16.	Nachweis von β-Ketoadipinsäure (Rothera-Reaktion)	34
17.	Glucose-Bestimmung	35
18.	Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs	35
19.	Proteinbestimmungen	36
20.	Bestimmung der reaktionskinetischen Parameter der Coniferylalkohol-Dehydrogenase	37
21.	Herstellung von nicht käuflichen Substanzen	40

III. Ergebnisse 42

1. Ermittlung geeigneter Kulturbedingungen 42
2. Wachstum auf verschiedenen Kohlenstoffquellen und Umwandlung von Aromaten 45
3. Isolierung der Coniferylalkohol-Dehydrogenase 55
4. Charakterisierung der angereicherten Coniferylalkohol-Dehydrogenase 63
5. Abbauwege der Aromaten und Regulation der ringspaltenden Dioxygenasen 74
6. Versuche mit Mischsubstraten in kontinuierlicher Kultur 85

IV. Diskussion 96

V. Zusammenfassung 106

VI. Literaturverzeichnis 108

I. EINLEITUNG

Neben Cellulose und Hemicellulose ist Lignin mengenmäßig der bedeutendste Bestandteil höherer Pflanzen. Der Anteil des Lignins in pflanzlichem Gewebe variiert zwischen 17 - 33 % (Timell und Syracuse, 1967). Es bildet mit den Polysacchariden eine enge Verbindung und bewirkt die mechanische Festigkeit der Zellwände sowie die Resistenz der Pflanzen gegenüber mikrobieller Zersetzung.

Während am Aufbau des Lignins bei Gramineen hauptsächlich Coniferyl-, Sinapyl- und Cumarylalkohol beteiligt sind, besteht das Lignin der Angiospermen aus einem Gemisch von Coniferyl- und Sinapylalkohol und das Coniferenlignin vorwiegend aus Coniferylalkohol. Die einzelnen Phenylpropan-Bausteine sind durch verschiedenartige Äther- und C-C-Bindungen miteinander verbunden.

Grundlegende Erkenntnisse über die Struktur und Biogenese des Lignins wurden von Freudenberg und Mitarbeiter gewonnen (Freudenberg et al., 1952, Freudenberg und Neish (1968). Sie konnten in vitro ein Dehydrierungspolymerisat (DHP) aus Coniferylalkohol mit Hilfe der Phenoloxidasen Laccase und Sauerstoff oder Peroxidase und Wasserstoffperoxid synthetisieren, das große Übereinstimmung mit einem aus Fichtenholz isolierten Lignin besaß (Björkmann, 1954 ; Nimz et al., 1974).
Aufgrund dieser Versuche wurde ein Modell der Ligninstruktur entwickelt, das in Abb. 1 dargestellt ist.

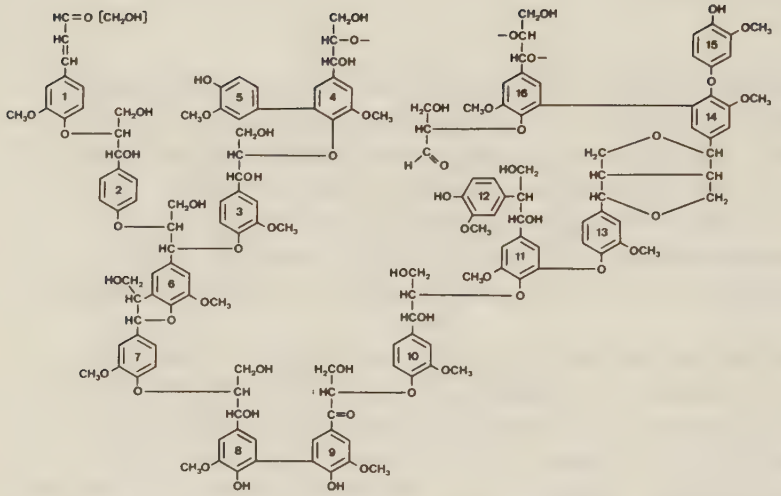


Abb. 1: Modell der Ligninstruktur nach Ander und Eriksson (1978).

Aus dem Strukturmodell ist ersichtlich, daß Lignin im Gegensatz zu den anderen Biopolymeren, Proteinen, Polysacchariden und Nucleinsäuren, nicht aus alternierenden Bindungstypen aufgebaut ist. Besonders häufig vorkommende intermonomere Bindungen im Lignin sind Arylglycerol-β- Aryl-Äther,wie sie in der Abbildung zwischen den Einheiten 1 und 2,3 und 4, 7 und 8, 9 und 10 und 10 und 11 zu sehen sind. Sie machen etwa einen Anteil von 40 - 60 % im Ligninmolekül aus. Andere Bindungstypen sind die Phenylcumaran-Struktur (zwischen 6 und 7; 10 - 20 %), die Biphenyl-Struktur (zwischen 8 und 9, 14 und 16; 10 - 25 %), die Diaryl-Äther (zwischen 11 und 13, 14 und 15), die Pinoresinol-Struktur (zwischen 13 und 14), Benzyl-Äther (zwischen 3 und 6) und andere (zwischen 11 und 12, 4 und 5) (Kirk,1971).

Sowohl die in vitro-Synthese des DHPs als auch die Bildung des nativen Lignins in der Pflanze wird durch eine enzymatische Dehydrierung der Phenylpropane durch Phenoloxidasen einge-

leitet (Harkin und Obst, 1973). Das dabei entstehende Radikal besitzt mehrere mesomere Grenzformen, die untereinander reagieren können (radikalische Kupplung). Dieser Prozeß läuft spontan und ohne enzymatische Kontrolle ab, wodurch sich zunächst Di-, Tri- und Oligomere bilden (Abb. 2). Diese polymerisieren durch weitere Radikalbildung oder gehen durch Chinonmethid-Addition eine Verbindung mit den Zellwandkohlenhydraten ein (Higuchi,1980).

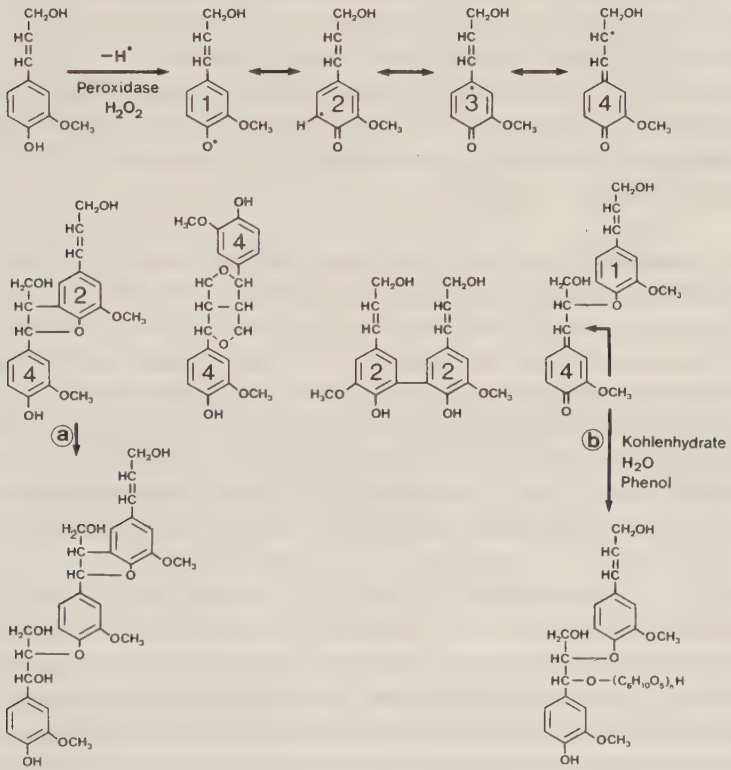


Abb. 2: Verschiedene Radikale des Coniferylakohols (1,2,3 und 4), die untereinander zu Dilignolen reagieren (nach Weissenböck, 1976).
Die Reaktion mit weiteren phenolischen Radikalen (a) und die Chinonmethid-Addition (b) führen zur Polymerisation und zur Bildung des Lignin-Kohlenhydrat Komplexes.

Wegen seiner komplexen Struktur wird Lignin im Gegensatz zu Cellulose und Hemicellulose nur sehr langsam mikrobiell abgebaut.
Am Abbau des Lignins sind in der Natur Weißfäule-, Braunfäule - und Moderfäulepilze, sowie einige Bakterien beteiligt (Haider et al., 1964; Haider, 1965; Kirk 1971). Während Braunfäulepilze Lignin nur teilweise modifizieren (Kirk und Adler 1969, Kirk und Adler,1970; Kirk,1970) können Weißfäulepilze in Anwesenheit einer leicht verwertbaren Kohlenstoffquelle, wie z. B. Glucose, Cellulose oder Hemicellulose Lignin vollständig abbauen (Kirk et al., 1976).
Deswegen sind die meisten Untersuchungen zum Abbau des Lignins mit Weißfäulepilzen gemacht worden. Spezifische Abbauwege und Enzymsysteme konnten jedoch bisher nicht gefunden werden (Crawford und Crawford, 1980).

Stark abgebaute Lignine weisen einen niedrigeren Gehalt an Methoxylgruppen auf (Kirk und Chang, 1975; Kirk et al., 1977; Kirk et al., 1978 a) und besitzen, wie Hata (1966) beschrieb, mehr phenolische Hydroxylgruppen. Die durch Demethoxylierung und/oder eine nachfolgende Hydroxylierung entstandenen o-Diphenole können, wie die einfachen Aromaten, intradiol oder extradiol gespalten werden (Haider und Grabbe, 1967). Dementsprechend fanden Kirk und Chang (1975) auch Ketten aliphatischer Säuren im Ligninmolekül, die weiter hydrolytisch abgebaut werden.

Ferner zeigen chemische Analysen eine Zunahme an Carboxyl- und Carbonylgruppen, die durch Oxidation der Phenylpropan-Seitenketten entstehen (Kirk und Chang,1975). Außerdem kann die Spaltung einer Ätherbindung zwischen den monomeren Bausteinen zur Freisetzung niedermolekularer Fragmente,wie Dehydrodivanillin, Coniferylaldehyd und Vanillinsäure führen, die von den Weißfäulepilzen oder anderen Organismen metabolisiert werden (Flaig und Haider, 1961).
In der folgenden Abbildung sind die erwähnten Umwandlungen des Lignins, die durch Weißfäulepilze hervorgerufen werden, dargestellt.

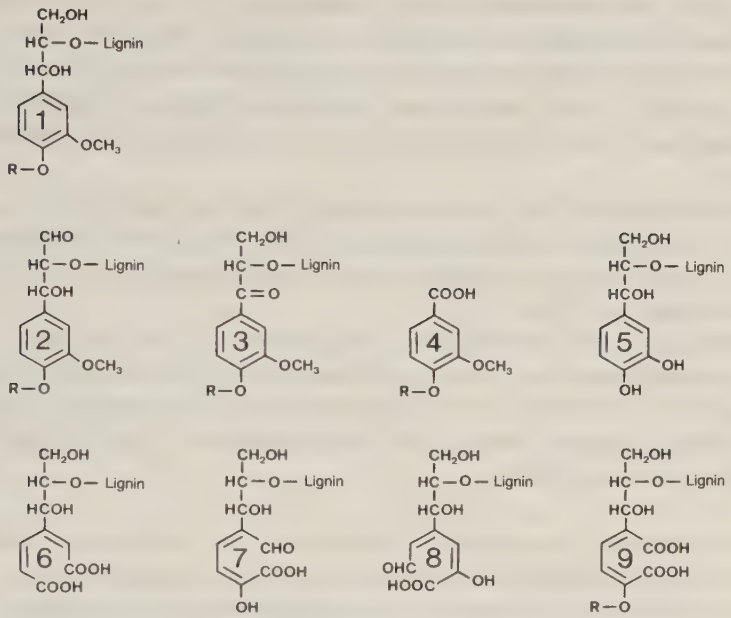


Abb. 3: Beispiele für Oxidationsreaktionen am Lignin durch Weißfäulepilze (nach Crawford und Crawford, 1980) (R bedeutet entweder ein H-Atom oder eine intermonomere Ätherbindung.) An der intakten Phenylpropan Einheit (1) werden folgende Reaktionen durchgeführt: (2) Oxidation der terminalen Alkoholgruppe, (3) α-Carbonyl-Bildung, (4) Abspaltung der Seitenkette, (5) Demethoxylierung zu o-Diphenol, (6) ortho-Ringspaltung, (7 + 8) meta-Ringspaltung, (9) ortho-Ringspaltung.

Da Lignin ein großes, dreidimensionales Molekül ist, sollten die genannten Reaktionen durch extrazelluläre oder zellwandgebundene Enzyme katalysiert werden (Kirk und Chang, 1975). Bislang sind aber extrazellulär nur Phenoloxidasen nachgewiesen worden, deren Bedeutung beim Ligninabbau noch nicht vollständig geklärt ist.

Mit Hilfe des Bavendamm Tests (Bavendamm, 1928), wurde gezeigt, daß bei Weißfäulepilzen parallel zur Delignifizierung auch Phenoloxidasen gebildet werden (Sundman und Näse, 1971; Kirk und Kelmann, 1965), was zu der Vermutung führte, daß Phenoloxidasen am Ligninabbau beteiligt sind (Ishihara und Miyazaki, 1974).
Dies wurde durch die Isolation einer Phenoloxidase-Minus-Mutante von *Sporotrichum pulverulentum*, die Lignin im Gegensatz zum Wildtyp nicht mehr abbauen kann, bekräftigt (Ander und Eriksson, 1976).
Andererseits stellten Haider (1965) und Hiroi und Eriksson (1976) die Notwendigkeit der Phenoloxidase beim Ligninabbau in Frage. So konnten auch Haars und Hüttermann (1980) bei dem Weißfäulepilz *Fomes annosus* zeigen, daß die Anwesenheit von Laccase den Ligninabbau verhindert.

Phenoloxidasen können sowohl Lignin als auch Modellsubstanzen zu o-Chinonen demethylieren, die weiter zu Catechol-Einheiten reduziert und durch die ringspaltenden Dioxygenasen oxidiert werden. Durch die Bildung von Phenoxyradikalen werden auch niedermolekulare Ligninfragmente von Phenoloxidasen polymerisiert (Ishihara, 1980). Daher wird allgemein angenommen, daß ihre Hauptaufgabe vornehmlich in der Detoxifizierung von Ligninabbauprodukten besteht (Gadd, 1957; Rösch 1966; Grabbe et al., 1968; Eriksson und Lindholm, 1971).

Am wenigsten untersucht sind bisher die Mechanismen des Ligninabbaus bei Bakterien.
Es wurde zwar mehrfach beschrieben, daß Bakterien Lignin angreifen (Sörensen, 1962; Sundman et al., 1968), doch können sie nach Meinung von Jaschhof (1964) nicht die phenolischen Ätherbindungen spalten.
Auch bei einem intensiven Screening zahlreicher Bodenproben aus verschiedenen Ökotopen konnte kein Stamm isoliert werden, der wesentlich am Ligninabbau beteiligt war (Cartwright und Holdom, 1973).

Erst neuere Untersuchungen (Trojanowski et al., 1977; Odier und Monties, 1977; Deschamps et al., 1980) haben gezeigt, daß Bakterien durchaus in der Lage sind Lignin abzubauen.
So beschrieben Odier und Monties (1978), daß ein *Xanthomonas* Stamm Dioxan-Lignin innerhalb von 15 Tagen zu 77 % verwertet.

Ferner wurden in den letzten Jahren durch Versuche mit ^{14}C-markiertem Lignin auch nähere Angaben über die Art des bakteriellen Ligninabbaus erhalten. Derartige Versuche wurden insbesondere mit Organismen der Gattungen *Nocardia* und *Pseudomonas* (Trojanowski et al., 1977; Haider et al., 1978), *Bacillus* (Robinson und Crawford, 1978) und *Streptomyces* (Crawford und Sutherland, 1980) durchgeführt.
Sie ergaben, daß die spezifisch markierten Methoxylgruppen, die Seitenketten sowie die aromatischen Ringe des nativen und synthetischen Lignins zu $^{14}CO_2$ oxidiert werden.

Ähnliche Reaktionen werden auch beim Abbau niedermolekularer Aromaten festgestellt. Diese können daher als Ligninmodellsubstanzen zur Untersuchung enzymatischer Abbaumechanismen eingesetzt werden (Eriksson, 1980; Cain, 1980).

Wie zahlreiche Arbeiten zum Abbau niedermolekularer Aromaten mit Bakterien (Dagley, 1971; Chapman, 1972; Stanier und Ornston,1973) und mit Pilzen (Cain et al.,1968; Cook und Cain, 1974; Thatcher, 1971; Huber et al., 1975; Ahlquist,1977) zeigten, werden diese Substanzen vor der Ringspaltung zu ortho- oder para-Diphenolen oxidiert. Der weitere Abbau erfolgt meist über den β-Ketoadipat-Weg, was eine intradiol-Spaltung von Protocatechusäure oder Catechol voraussetzt.
Beide Substrate können aber auch extradiol, wie die Ausgangssubstrate der anderen Aromatenabbauwege, Gentisinsäure, Homogentisinsäure und Homoprotocatechusäure, gespalten werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Abbau von Aromaten mit dem Lignin oxidierenden Bakterium *Rhodococcus erythropolis* untersucht. Ferner sollten Wachstumsexperimente auf komplexeren Substraten mit verschiedenen Bindungstypen Aufschluß über die enzymatischen Fähigkeiten des Organismus geben.
Es wurde dabei ein Enzym isoliert, dessen Beteiligung an der Oxidation von Ligninmodellsubstanzen und von DHP näher untersucht wurde.

II. MATERIAL UND METHODEN

1. Organismen

Nocardia spec. DSM (1069) wurde freundlicherweise von Herrn Dr. Haider (Landwirtschaftliche Versuchsanstalt, Völkenrode) zur Verfügung gestellt. Von diesem Organismus ist bekannt, daß er sowohl Aromaten als auch Lignin oxidieren kann (Trojanwoski et al., 1977). Bei einer Nachbestimmung des Organismus im Institut für Hygiene der Universität Köln wurde der Stamm als *Rhodococcus erythropolis* identifiziert.
Die in dieser Arbeit isolierten Mutanten von *R.erythropolis* und ihre Eigenschaften sind in der folgenen Tabelle aufgeführt.

Mutante	Eigenschaften
Vanillinsäure$^{\ominus}$	Verlust der Fähigkeit zur Demethoxylierung von Vanillinsäure
Protocatechusäure$^{\ominus}$	Verlust der Fähigkeit zur Ringspaltung von Protocatechusäure in ortho-Stellung
β-Carboxy-cis-cis-Muconsäure$^{\ominus}$	Verlust der Oxidationsfähigkeit von β-Carboxy-cis-cis-Muconsäure
Catechol$^{\ominus}$	Verlust der Fähigkeit zur Ringspaltung von Catechol in ortho-Stellung
cis-cis-Muconsäure$^{\ominus}$	Verlust der Oxidationsfähigkeit von cis-cis-Muconsäure
β-Ketoadipinsäure$^{\oplus}$	Fähigkeit, auf β-Ketoadipinsäure zu wachsen
Guaiacol$^{\oplus}$	Fähigkeit, auf Guaiacol zu wachsen

Tab. 1: Die Tabelle zeigt die vom Wildtyp *R.erythropolis* isolierten Mutanten und ihre Eigenschaften.

2. Chemikalien

Chemikalien, die in der folgenden Tabelle nicht aufgeführt sind, wurden in analysenreiner Form von der Firma Merck, Darmstadt, bezogen.

Acrylamid	Serva, Heidelberg
Adipinsäure	Sigma, München
Bacto-Agar	Difco Laboratories, Detroit, USA
β-Carboxy-cis-cis-Muconsäure	Prof. Cain, Canterbury, Großbritannien
cis-cis-Muconsäure	Prof. Knackmuss, Göttingen
Coniferylalkohol	Roth, Karlsruhe
Coomassie-Brillant Blau G250	Serva, Heidelberg
Cumaran (Benzofuran)	Ega-Chemie, Steinheim
Cumaron (2,3-Dihydrobenzofuran)	" "
Dehydrodiconiferylalkohol	Prof. Higuchi, Kyoto, Japan
Dehydrodivanillin	Prof. Kern, KFA-Jülich
Dehydrodivanillinsäure	" "
Dehydrodivanillylalkohol	" "
3-(3,4-Dimethoxyphenyl)-1-Propanol	Ega-Chemie, Steinheim
DL-Dithiothreitol (Cleland's Reagent)	Sigma, München
Eichproteine für die Gelfiltration	Pharmacia, Uppsala, Schweden
Guaiacylglycerol-β-Coniferyläther	Prof. Higuchi, Kyoto, Japan
Hefeextrakt	Difco Laboratories, Detroit, USA
4-Hydroxy-3-Methoxyacetophenon	Ega-Chemie, Steinheim
3-(4-Hydroxyphenyl)-Propanol	" "
Homovanillylalkohol	" "
Isoeugenolbenzyläther	ICN Pharmaceuticals, New York, USA
β-Ketoadipinsäure	Sigma, München

4-(p-Methoxyphenyl)-1-Butanol	Ega-Chemie, Steinheim
p-Nitroblau-Tetrazolium-chlorid	Serva, Heidelberg
Peroxidase	Boehringer, Mannheim
Phenazin-Methosulfat	Serva, Heidelberg
2-Phenoxybenzoesäure	Ega-Chemie, Steinheim
β-Phenoxypropiophenon	" "
1-Phenyl-1-Propanol	" "
Polypropylenglycol P 2000	Roth, Karlsruhe
Solka-Floc	Brown Company, Berlin
Succinyl-CoA	Sigma München
Temed	Serva, Heidelberg
Veratrylalkohol	Ega-Chemie, Steinheim
Zimtalkohol	Fluka, Buchs, Schweiz

3. Nährmedien

a) Komplettmedium für die Vorkulturen und die Stammhaltung

Hefeextrakt	10 g
Glucose	10 g
KH_2PO_4	1 g
$MgSO_4$	0,5 g
Aqua dest.	1000 ml

Der pH-Wert wurde auf 7,0 eingestellt.

b) Minimalmedium

KH_2PO_4	0,4 g
K_2HPO_4	1,6 g
NH_4NO_3	0,5 g
$MgSO_4 \cdot 5\ H_2O$	0,2 g
Spurensalze	1 ml

Fe-EDTA-Lösung	1	ml
Aqua dest.	1000	ml

Der pH-Wert wurde auf 7,0 eingestellt. $MgSO_4$ wurde getrennt autoklaviert. Zur Verfestigung der Medien wurde 2 % (w/v) Bacto Agar zugesetzt.
Die entsprechenden Substrate wurden über Millipore Sterilfilter (Porengröße 0,2 µm) sterilfiltriert und dem Medium nach dem Autoklavieren, wenn nicht anders angegeben, in einer Konzentration von 0,5 g/l zugegeben.

Die Spurensalzlösung enthielt folgende Substanzen:

Borsäure	0,05	g
$CaCl_2$	0,05	g
$CuSo_4 \cdot 5\ H_2O$	0,1	g
$MnSO_4 \cdot H_2O$	0,05	g
$ZnSO_4 \cdot 7\ H_2O$	0,1	g
Aqua dest.	100	ml

Die Fe-EDTA-Lösung wurde wie folgt angesetzt (Jacobson, 1951):

Titriplex II	6,53	g
KOH (1N)	27	ml
$FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$	6,25	g

Titriplex II (Äthylendiamintetraacetat) wurde in der 1N Kalilauge gelöst und $FeSO_4$ zugegeben. Mit Aqua dest. wurde ein Volumen von 250 ml eingestellt. Dieser Ansatz wurde solange belüftet (16 h) bis das Fe^{2+} zu Fe^{3+} oxidiert war, was an der rotbraunen Farbe erkenntlich wird. 1 ml der Lösung enthält ca. 5 mg Fe^{3+}-Ionen.

4. Kulturbedingungen

a) Anzucht im Schüttelkolben

Sämtliche Vorkulturen wurden submers in 500 ml Erlenmeyerkolben mit zwei Schikanen in 100 ml Komplettmedium auf einer Schüttelmaschine (100 Ump) 22 h bei 27°C gezüchtet. Die Zellen wurden dann abzentrifugiert und mit steriler physiologischer Kochsalzlösung gewaschen. Die Hauptkulturen wurden mit ca. 10^8 Zellen pro 100 ml Kulturmedium beimpft und unter den gleichen physikalischen Bedingungen wie die Vorkulturen angezogen.

b) Züchtung im Fermenter

Größere Zellmengen wurden in einem 12 l-Fermenter (Biostat V, Braun Melsungen) mit einem Schikanen-Wärmetauscher angezogen. Der pH-Wert wurde mit 1N Natronlauge und 1N Phosphorsäure, auf pH 7,0 geregelt. Die Kultur wurde mit 800 Upm gerührt und mit 1 l Luft pro l Kulturflüssigkeit und Minute begast. Als Antischaummittel wurde bei Bedarf Polypropylenglycol 2000 (Merck, Darmstadt) zugegeben.

c) Kontinuierliche Kulturen

Für die kontinuierlichen Kulturen wurde ein 1,8 l-Biostat V-Fermenter (Braun Melsungen) mit einem Arbeitsvolumen von 650 ml benutzt. Um ein Festwachsen der Zellen an Glas- und Metallteilen zu verhindern, wurde der Fermenter geringfügig umgebaut. Als Schikanen fungierten nur das Thermometer, die pH-Elektrode, der Wärmetauscher (U-Rohr)und das Überlaufrohr. Außerdem wurde der konkav geformte Glaszylinder durch einen mit geraden Wandungen ersetzt.

Das Medium wurde mit einer Schlauchpumpe (Gilson Minipuls II) über eine Thermofalle in den Fermenter gepumpt. Der Abfluß wurde über ein Überlaufrohr geregelt. Um den Luftaustritt durch das Medium-Ablußrohr zu verhindern, war der Abflußschlauch vor dem Auffanggefäß U-förmig geformt und ständig mit Flüssigkeit gefüllt.
Die Kultur wurde mit 1300 Upm gerührt, mit 1 v/v Luft begast und der pH-Wert wie bei den anderen Fermenterkulturen geregelt.

5. Bestimmung der Wachstumsleistung

a) Trübungsmessung

Die optische Dichte einer gewaschenen Zellsuspension wurde bei der Wellenlänge 600 nm in einem Zeiss Spektralphotometer PM 6 gemessen. Anhand einer Eichkurve wurde aus der Trübungsmessung die Zellzahl ermittelt. 100 ml der Hauptkultur wurden mit etwa 10^8 Zellen angeimpft.

b) Trockengewichtsbestimmung

Proben von 20 ml wurden abzentrifugiert, zweimal gewaschen und in Aqua dest. aufgenommen. Diese Suspension wurde in Aluminiumschälchen gegossen, die vorher 16 Stunden bei 100 - 110°C getrocknet und anschließend gewogen worden waren. Nach weiteren 16 h Trocknung der gefüllten Schälchen bei 100 -110°C konnte das Trockengewicht der Probe bestimmt werden.
Zur Bestimmung des Trockengewichts aus der optischen Dichte wurde eine Eichkurve mit Zellen, die auf 0,5 g/l Protocatechusäure gewachsen waren aufgenommen.

6. Mutagenese und Isolierung der Mutanten

a) Defektmutanten

100 ml Komplettmedium wurde mit $3 \cdot 10^8$ Zellen aus einer Vorkultur beimpft und 4 Stunden inkubiert. Zu diesen exponentiell wachsenden Zellen wurde 1 mg/ml 1-Methyl-3-Nitro-1-Nitroso-Guanidin (gelöst in DMSO) gegeben. Dieser Ansatz wurde 20 Minuten bei 27°C auf der Schüttelmaschine inkubiert. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert, zweimal mit Saline gewaschen, in Saline aufgenommen und auf Komplettmedium ausplattiert.
Diese Platten wurden 48 Stunden bei 27°C inkubiert und danach das Koloniemuster durch Stempeln auf Testplatten mit den gewünschten Substraten (Catechol, β-Carboxy-cis-cis-Muconsäure, cis-cis-Muconsäure, Protocatechusäure, Vanillinsäure) übertragen.
Kolonien, die mit den oben genannten Kohlenstoff- und Energiequellen nicht mehr wuchsen, deren Wachstum auf einer Vergleichsplatte mit Glucose jedoch unbeeinträchtigt war, wurden als entsprechende Negativ-Mutanten isoliert.

b) Isolierung von β-Ketoadipinsäure und Guaiacol verwertenden Mutanten

Der Wildtyp von *R.erythropolis* kann β-Ketoadipinsäure nicht verwerten. Es wurde daher versucht, aus einer Hungerkultur eine Mutante zu isolieren, die β-Ketoadipinsäure metabolisiert.
Dazu wurde ein Kolben mit 100 ml Minimalmedium, 0,3 g/l β-Ketoadipinsäure und 50 mg/l Glucose aus einer Vorkultur des Wiltyps beimpft und inkubiert. Nach ca. 14 Tagen wurde Wachstum festgestellt und es konnte ein Stamm isoliert werden, der in der Lage war, ohne lag-Phase auf β-Ketoadipinsäure zu wachsen.

Ebenso wurde eine Mutante erhalten, die im Gegensatz zum Wildtyp mit Guaiacol als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle wachsen kann.

7. Herstellung von Rohextrakten

Die Zellen wurden durch Zentrifugation (8 min/4000 g) geerntet, nach zweimaligem Waschen mit 100 mM Kalium-Phosphatpuffer pH 7,5 in den selben Puffer resuspendiert und in vorgekühlte (-20°C) X-Pressen (AB Biox, Nacka, Schweden) gefüllt. In tiefgefrorenem Zustand wurden die Zellen mit Hilfe einer Hydraulik-Presse mehrmals durch eine Öffnung von 0,8 mm Durchmesser gepreßt, wobei die Zellwände und die Membranen zerstört werden. Die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation (30 min/30 000 g, 4°C) abgetrennt und der Überstand als Rohextrakt für enzymatische Untersuchungen benutzt.

8. Bestimmung der Enzymaktivitäten

Die Aktivität aller nachfolgend aufgeführten Enzyme wurde durch kinetische Messungen in einem Zeiss Spektralphotometer PM 6 bestimmt. Unter den angegebenen Bedingungen entspricht eine Enzymeinheit dem Umsatz von einem µmol Substrat pro Minute. Als spezifische Aktivität wurde die Anzahl der Enzymeinheiten pro Milligramm Protein definiert.

a) Catechol-1,2-Dioxygenase (E.C.1.13.1.1.)

Der Reaktionsansatz enthielt in einem Gesamtvolumen von 3 ml (Hegemann, 1966):

EDTA (Äthylendiamintetraacetat)	4	µmol
Catechol	0,3	µmol
Kalium-Phosphat-Puffer pH 7,0	200	µmol
Enzym (Rohextrakt)		

Die Zunahme von cis-cis-Muconsäure wurde bei einer Wellenlänge von 260 nm in einer 1 cm Quarzküvette und bei einer Temperatur von 24°C bestimmt.
Catechol absorbiert in diesem Wellenlängenbereich nur sehr schwach. Durch die Zugabe von EDTA wird das in der Reaktionskette folgende Enzym (Muconsäure-Cycloisomerase E.C.5.5.1.1.) gehemmt, so daß das Produkt der Reaktion, die cis-cis-Muconsäure, akkumuliert wird (Sistrom und Stanier, 1954). EDTA hat in der eingesetzten Konzentration keinen Einfluß auf die Aktivität der Catechol-1,2-Dioxygenase. Der Extinkionskoeffizient von cis-cis-Muconsäure beträgt unter diesen Bedingungen 16,80 $cm^2 \cdot \mu mol^{-1}$

b) Catechol-2,3-Dioxygenase (E.C.1.13.1.2.)

Der Reaktionsansatz enthielt in einem Gesamtvolumen von 3 ml (Feist und Hegemann, 1969):

Tris-HCl-Puffer pH 7,6	100	µmol
Catechol	0,2	µmol
Enzym (Rohextrakt)		

Die Bildungsrate des Reaktionsprodukts, 2-Hydroxy-Muconsäuresemialdehyd, wurde in einer 1 cm Küvette bei einer Wellenlänge von 375 nm und einer Temperatur von 24°C bestimmt. Der Extinktionskoeffizient von 2-Hydroxy-Muconsäuresemialdehyd beträgt 29,4 $cm^2 \cdot \mu mol^{-1}$.

c) Protocatechuat-3,4-Dioxygenase (E.C.1.13.1.3.)

Der Test wurde nach Fujisawa und Hayaishi (1968) durchgeführt und enthielt in 3 ml Reaktionsvolumen:

Protocatechusäure	1,2	µmol
Tris-Acetat-Puffer pH 7,5	150	µmol
Enzym (Rohextrakt)		

Die Abnahme der Protocatechusäure wurde bei einer Wellenlänge von 290 nm, in einer Quarzküvette mit 1 cm Lichtweg und bei einer Temperatur von 24°C bestimmt.
Der Test beruht darauf, daß sich die Absorptionsmaxima von Protocatechusäure und β-Carboxy-cis-cis-Muconsäure, die als Produkt aus der Reaktion hervorgeht, unterscheiden. Protocatechusäure besitzt ein Absorptionsmaximum bei 290 nm, β-Carboxy-cis-cis-Muconsäure dagegen bei 270 nm.
Eine Enzymeinheit bewirkt unter den angegebenen Bedingungen eine Änderung der Absorption von 0,75 Einheiten pro Minute (Stanier, 1955). Dies ist äquivalent mit der Abnahme von 1 µmol Protocatechusäure pro Minute.

d) Protocatechuat-4,5-Dioxygenase (E.C.1.13.11.8.)

In 3 ml des Reaktionsansatzes waren enthalten (Ono et al., 1970):

Protocatechusäure		1 µmol
Kalium-Phosphat-Puffer	pH 7,0	150 µmol
Enzym (Rohextrakt)		

Während Protocatechusäure ein zweites Absorptionsmaximum im UV-Bereich bei 250 nm besitzt, absorbiert der entstehende 2-Hydroxy-4-Carboxy-Muconsäuresemialdehyd nur im sichtbaren Wellenlängenbereich. Es wurde die Anfangsrate der Abnahme von Protocatechusäure bei der Wellenlänge 250 nm gemessen. Die Temperatur betrug 24°C, der Lichtweg 1 cm.
Der Extinktionskoeffizient von Protocatechusäure ist unter diesen Bedingungen 8,0 $cm^2 \cdot \mu mol^{-1}$.

e) Protocatechuat-2,3-Dioxygenase

Der Reaktionsansatz enthielt in einem Gesamtvolumen von 3 ml (Crawford, 1975 a)

Kalium-Phosphat-Puffer pH 7,2	0,3	mmol
Procatechusäure	0,1	µmol
Enzym (Rohextrakt)		

Die Bildung von 2-Hydroxy-5-Carboxy-Muconsäuresemialdehyd wurde bei einer Wellenlänge von 375 nm in einer 1 cm Küvette und bei 24°C verfolgt. Der Extinktionskoeffizient von 2-Hydroxy-5-Carboxy-Muconsäuresemialdehyd beträgt 33,0 $cm^2 \cdot \mu mol^{-1}$.

f) 4-Hydroxybenzoat-3-Monooxygenase (E.C.1.14.13.2.)

Der Reaktionsansatz nach Hosokawa und Stanier (1966) enthielt in einem Gesamtvolumen von 3 ml folgende Reagenzien:

Tris-HCl-Puffer pH 8,0	100	µmol
FAD	0,01	µmol
NADPH	0,45	µmol
4-Hydroxybenzoesäure	1	µmol
Enzym (Rohextrakt)		

Die 4-Hydroxybenzoesäure abhängige Oxidation von NADPH wurde bei einer Wellenlänge von 340 nm und einer Temperatur von 24°C bei 1 cm Lichtweg gemessen.
Eine Enzymeinheit oxidiert 1 µmol NADPH pro Minute. Der Extinktionskoeffizient von NADPH beträgt 6,22 $cm^2 \cdot \mu mol^{-1}$.

g) β-Ketoadipat-Succinyl-CoA-Transferase (E.C.2.8.35.)

Das Enzym wurde nach der Methode von Cánovas und Stanier (1967) bestimmt. In 3 ml des Reaktionsansatzes waren enthalten:

Tris-HCl-Puffer pH 8,0	100	µmol
$MgCl_2$	20	µmol
β-Ketoadipinsäure	10	µmol
Succinyl-CoA	0,5	µmol
Enzym (Rohextrakt)		

Die Extinktionszunahme, die auf die Bildung von β-Ketoadipyl CoA zurückzuführen ist, wurde bei der Wellenlänge 305 nm und bei einer Temperatur von 24°C gemessen. Da der Extinktionskoeffizient des Produkts nicht bekannt ist, wurde entsprechend Cánovas und Stanier (1967) die Änderung von einer Extinktionseinheit pro Minute als relatives Maß für die Bildung einer bestimmten Produktmenge definiert.

h) Coniferylalkohol-Dehydrogenase

Der Reaktionsansatz enthielt in einem Gesamtvolumen von 1 ml:

Coniferylalkohol	4	µmol
NAD^+	2	µmol
Semicarbazid	0,1	mmol
Tris-HCl-Puffer pH 9,0	0,2	mmol
Enzym (Rohextrakt)		

Der Test wurde bei einer Temperatur von 24°C durchgeführt. Die Zunahme von Coniferylaldehyd wurde bei einer Wellenlänge von 400 nm in einer 1 cm Quarzküvette gemessen. Unter diesen Bedingungen beträgt der Extinktionskoeffizient von Coniferylaldehyd 22,4 $cm^2 \cdot \mu mol^{-1}$.

Semicarbazid wurde dem Ansatz zugegeben, um den entstehenden Aldehyd abzufangen.
Zur Bestimmung der Michaelis-Konstanten mittels des Mikrocomputers wurde der Test leicht abgewandelt. Der entstehende Coniferylaldehyd wurde bei einer Wellenlänge von 450 nm in einer Küvette mit 0,2 mm Lichtweg gemessen. Der Extinktionskoeffizient für Coniferylaldehyd beträgt unter diesen Bedingungen 5,38 $cm^2 \cdot \mu mol^{-1}$.

Zur Bestimmung des Extinktionskoeffizienten wurden Spektren von Coniferylaldehyd bei pH 9,0 in Tris-HCl-Puffer (50 mM) sowie bei pH 7,0 in Kalium-Phosphat-Puffer (50 mM) mit einem Zeiss Spektralphotometer DM 4 aufgenommen (Abb. 4). Bei alkalischem pH-Wert ist das Absorptionsmaximum von Coniferylaldehyd zum längerwelligen Bereich verschoben. Bei pH 9,0 liegt ein Maximum an der Stelle λ=403 nm, bei pH 7,0 liegt ein Maximum bei λ=338 nm.

Für beide Puffersysteme wurde an den jeweiligen Maxima die Extinktion verschieden konzentrierter Coniferylaldehyd-Lösungen gemessen, woraus mittels Regression die Werte des Extinktionskoeffizienten für die Konzentration 1 µmol/ml ermittelt wurde.

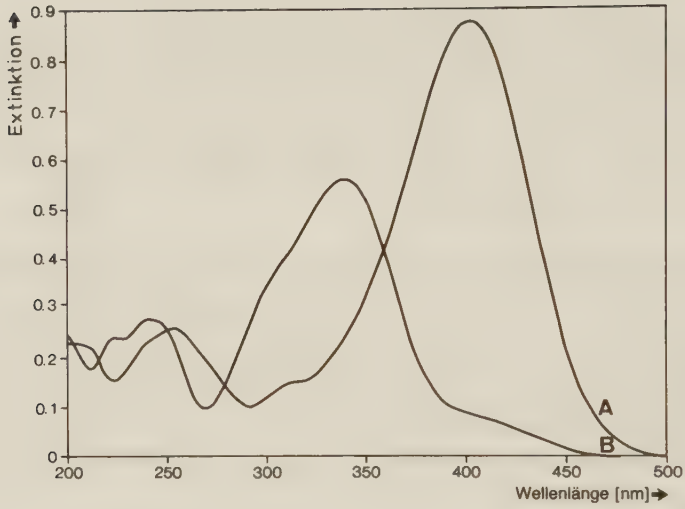


Abb. 4: Die Abbildung zeigt Spektren von Coniferylaldehyd in Tris-HCl-Puffer pH 9,0 (**A**) und in Kalium-Phosphat-Puffer pH 7,0 (**B**).

Aktivitätstests der Coniferylalkohol-Dehydrogenase mit anderen Substraten als Coniferylalkohol wurden durch Messung des entstehenden NADH bei einer Wellenlänge von 340 nm verfolgt. Enzymeinheiten und spezifische Aktivität wurden mit einem Extinktionskoeffizienten von 6,23 $cm^2 \cdot \mu mol^{-1}$ (Bergmeyer, 1974) für NADH berechnet.

9. Ammoniumsulfat-Fällung

Zu zellfreiem Extrakt wurde bei $0^{\circ}C$ im Eisbad fein gemörsertes Ammoniumsulfat langsam unter Rühren zugegeben. Der pH-Wert wurde mit 10 %iger Ammoniaklösung auf 7,5 konstant gehalten. Der Sättigungsgrad wurde nach folgender

Formel berechnet (Jaenicke 1966):

$$(NH_4)_2SO_4 \text{ (g)} = \frac{1{,}77 \cdot V(S-s)}{3{,}54 \cdot s}$$

V = Volumen der Lösung
S = gewünschte $(NH_4)_2SO_4$-Sättigung in Bruchteilen von 1 bei 0^oC
s = vorliegende $(NH_4)_2SO_4$-Sättigung in Bruchteilen von 1 bei 0^oC

Nach zweistündiger Gleichgewichtseinstellung wurde der Niederschlag abzentrifugiert (30 min, 48 000 g) und in Wasser aufgenommen.

10. Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Die analytische und präparative Polyacrylamidgel-Elektrophorese wurde nach einer leicht modifizierten Methode von Maurer (1971) mit 7 %igen Flachgelen ausgeführt. Analytische Gele wurden in einer Stärke von 1,5 mm gegossen. Es wurde eine Stromstärke von 8 mA und eine Spannung von 300 V angelegt. Die präparative Elektrophorese wurde mit 5 mm dicken Gelen bei 14 mA und 400 V durchgeführt. Für die Präparation der Gele wurden Lösungen verwandt, die in 100 ml Aqua dest. die folgenden Substanzen enthielten:

Lösung a)	Tris	36,3	g
	HCl, 1N	48	ml
	TEMED	0,23	ml
Lösung b)	Acrylamid	28,0	g
	Bisacrylamid	0,74	g

Lösung c)	Ammoniumperoxidisulfat	0,14	g
Lösung d)	Tris	5,98	g
	HCl, 1N	48	ml
	TEMED	0,46	ml
Lösung e)	Acrylamid	12	g
	Bisacrylamid	0,8	g
Lösung f)	Riboflavin	4	mg

Die Trenngele wurden durch Mischen der Lösungen im Verhältnis 1(a): 1,9(b): 1,1(H_2O): 4(c) hergestellt. Das Mischungsverhältnis für die Sammelgele betrug 1(d): 2(e): 1(H_2O): 4(f).

Als Elektrodenpuffer wurde ein 10-fach verdünnter Tris-Glycin-Puffer pH 8,3 verwandt.

Tris	6,0	g/l
Glycin	28,8	g/l

Nach der Elektrophorese wurden die Gele 16 Stunden in einem Coomassieblau-Bad gefärbt. Die Lösungen enthielten in 100 ml Aqua dest.:

Coamassie-Brillant-Blau G-250	0,05	% w/v
Isopropylalkohol	25	% v/v
Essigsäure	10	% v/v

Anschließend wurden die Gele mit 10 %iger Essigsäure entfärbt.

11. Aktivitätsfärbung der Coniferylalkohol-Dehydrogenase im Polyacrylamidgel

Die Bande der Coniferylalkohol-Dehydrogenase ließ sich mit einer leicht abgewandelten Methode nach Skyring et al., (1970) direkt im Polyacrylamidgel nachweisen. Das Gel wurde in 50 mM Tris-HCl-Puffer pH 9,0 mit:

Coniferylalkohol	1	mmol
NAD^+	1	mmol
Semicarbazid	1	mmol

inkubiert. Nach wenigen Minuten entwickelte sich eine intensiv gelbe Bande, die auf die Oxidation des Coniferylalkohols zu Coniferylaldehyd zurückzuführen war. Der stark gelb gefärbte Coniferylaldehyd diffundierte jedoch rasch in das Gel, so daß die Bande bald verwaschen erschien. Dies ließ sich durch ein nachfolgendes Bad des Gels in:

$MnCl_2$ (0,5 g/100 ml)	250	µl
Phenazin-Methosulfat (20 mg/100 ml)	5	ml
p-Nitroblau Tetrazolium	12,5	mg
50 mM Tris-HCl-Puffer pH 7,5	45	ml

einschränken, wobei die gelbe Farbe der Bande in eine braun-blaue Bande umschlug.

12. Methoden der Säulenchromatographie

Alle nachfolgenden Versuche wurden im Kühlraum bei 4^oC oder im Eisbad durchgeführt. Die Säulenmaterialien wurden jeweils, wie von der Herstellerfirma angegeben, vorbereitet.

a) Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Cellulose ·

Als Säulenmaterial wurde Diäthylaminoäthyl-Cellulose DE 32 der Firma Whatman (Maidstone, England) benutzt. Im Batch-Verfahren wurde die Adsorption des Enzyms an das Ionenaustauschermaterial getestet. Zu einer bestimmten Menge DEAE-Cellulose, die mit 10 mM Kalium-Phosphat-Puffer verschiedener pH-Werte und 0,01 % Natriumazid äquilibriert war, wurde gegen denselben Puffer dialysierter Rohextrakt gegeben. Die Suspension wurde geschüttelt und nach der Sedimentation des Gels die Enzymaktivität und der Proteingehalt im Überstand bestimmt. Anschließend wurden die Proteine mit steigender Molarität an NaCl eluiert und die Protein- und Aktivitätsmessungen wiederholt. Die Wirksamkeit des Austauschers und ein geeigneter Elutionsbereich wurden anhand der spezifischen Aktivität kalkuliert.

Als Elutionspuffer wurde 10 mM Kalium-Phosphat-Puffer pH 7,5 mit 0,175 M NaCl und 0,01 % Natriumazid benutzt. Die Säulenabmessungen waren 2,6 · 40 cm. Die Elutionsgeschwindigkeit betrug 50 ml/h. Ein Gradient von 0,175 M NaCl bis 0,35 M NaCl mit einem Gesamtvolumen von 500 ml wurde zur Elution der Proteine benutzt.

b) Affinitätschromatographie an Blue-Sepharose Cl-6B

Blue-Sepharose Cl-6B (Pharmacia, Uppsala, Schweden) wurde mit 10 mM Kalium-Phosphat-Puffer pH 7,5 mit 0,01 % Natriumazid äquilibriert. Eine 1,6 · 14 cm Säule wurde benutzt. Die Elutionsgeschwindigkeit betrug 19,5 ml/h. Mit einem NAD^+-Gradienten von 0 - 20 mM in jeweils 250 ml Puffer wurde die Probe eluiert.

c) Gelfiltration an Sephadex G-200

Sephadex G-200 (Pharmacia, Uppsala, Schweden) wurde in einer 2,6 • 86 cm Säule mit 10 mM Tris-HCl-Puffer pH 7,2, 100 mM NaCl, 10 mM Dimercaptoäthanol und 0,02 % Natriumazid äquilibriert. Mit dem gleichen Puffersystem wurden die Proteine bei einer Elutionsgeschwindigkeit von 3,9 ml/h eluiert.

d) Gelfiltration an Biogel A 1,5

Das Säulenmaterial Biogel A 1,5 (200-400 mesh) wurde von der Firma Bio-Rad, München, bezogen. Die Trennung erfolgte in einer 7,6 • 81 cm Säule. Eluiert wurde mit 10 mM Kalium-Phosphat-Puffer pH 7,5 mit 0,01 % Natriumazid. Die Elutionsgeschwindigkeit betrug 10 ml/h.

e) Adsorptionschromatographie an Hydroxylapatit

Als Säulenmaterial wurde Hydroxylapatit der Firma Merck, Darmstadt, benutzt, das in einer 1,6 • 14 cm Säule mit 5 mM Kalium-Phosphat-Puffer plus 0,01 % Natriumazid äquilibriert wurde. An Hydroxylapatit gebundenes Protein wurde mit einem linearen Gradienten, zusammengesetzt aus 250 ml 5 mM Kalium-Phosphat-Puffer (plus 0,01 % Natriumazid) und 250 ml 55 mM Kalium-Phosphat-Puffer (plus 0,01 % Natriumazid) und einer Geschwindigkeit von 50 ml/h eluiert.

13. Dünnschichtchromatographie

Die im Kulturfiltrat enthaltenen aromatischen Substanzen und deren Folgeprodukte wurden nach Extraktion dünnschichtchromatographisch bestimmt.

a) Extraktion

Aus dem Kulturfiltrat wurde ein Aliquot Probe entnommen, zentrifugiert und filtriert. Der klare Überstand wurde mit 1N H_2SO_4 auf pH 2,0 angesäuert und zweimal mit dem halben Probenvolumen eines Gemischs aus Chloroform und Aceton (1:1 v/v) (Crawford et al., 1973a) im Scheidetrichter extrahiert.
Die Chloroform-Aceton-Phasen wurden vereint, die wässrige Phase verworfen. Die organische Phase wurde mit 1/5 ihres Volumens Aqua dest. gewaschen und über wasserfreies Dinatriumsulfat (Na_2SO_4) getrocknet. Die gefilterten Extrakte wurden anschließend bei 50°C im Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingeengt und für die Dünnschichtchromatographie in 1 ml Methanol aufgenommen.

b) Chromatographie

Für die Dünnschichtchromatographie wurden DC-Fertigplatten der Firma Merck, Darmstadt, mit einer 0,25 mm dicken Kieselgel 60 F_{254}-Beschichtung verwandt. Als Laufmittel wurden Benzol-Methanol-Essigsäure (90:16:8) und Butanol-Wasser (88:12) benutzt. Die Substanzen wurden unter UV-Licht (254 nm und 366 nm) lokalisiert und/oder mit Dinitrophenylhydrazin zum Nachweis von Aldehyden besprüht.
Das Sprühreagenz wurde wie folgt bereitet (Randerath, 1962): 0,5 g 2,4-Dinitrophenylhydrazin wurden in 100 ml 96 %igem Äthanol gelöst und anschließend 1 ml 25 %ige Salzsäure zugefügt. Aldehyde färbten sich damit intensiv gelb-orange.

14. Hochdruckflüssigkeitschromatographie

Die Proben für die Hochdruckflüssigkeitschromatographie wurden in entsprechende Probenfläschen klarfiltriert und ohne weitere Vorbehandlung mit einem HPLC-Gerät der Firma Hewlett-Packard 1082 B, das mit UV- und variablem Wellenlängen-Detektor ausgestattet war, analysiert. Die Trennung erfolgte an einer Reversed-Phase-Säule (Octylsilan, RP 8, Korngröße 10 µm, 25 cm · 4,6 mm) als stationäre Phase. Eluiert wurde isokratisch mit einem Gemisch aus Kalium-Phosphat-Puffer (pH 3,2; 5 mM) und Methanol (Reinheitsgrad: für die Chromatographie). Das Injektionsvolumen betrug stets 20 µl. Zur Identifizierung der Absorptions-Peaks wurden mit Hilfe des variablen Wellenlängen-Detektors von den verschiedenen Substanzen Spektren aufgenommen. Nachfolgend ist das Trennprogramm für ein Gemisch aus Coniferylalkohol, Coniferylaldehyd und Ferulasäure aufgeführt:

Durchflußrate (ml/min)	FLOW	1.50
Methanolanteil (%)	% B	34.00
Säulendruck	COLUMN P	55
maximaler Säulendruck	MAX P	250
minimaler Säulendruck	MIN P	0
Temperatur des Lösungsmittels A (Puffer) (^{o}C)	S-TEMP A	80
Temperatur des Lösungmittels B (Methanol) (^{o}C)	S-TEMP B	40
Temperatur des Säulenraums	OVEN TEMP	40
gewählter Detektor	UV SGNL	
gewählte Wellenlänge für Probe und Referenz	WAVL	254:430
Papiervorschub	CHT SPD	0.50
Lage der Null-Linie	ZERO	10
Verstärkung des Detektorsignals 2^{n}	ATTN 2↑	8
Peaks, die nicht aufgelistet werden	AREA REJ	0
Slope sensitivity (Markierung für Start- und Stopzeichen der Peak-Integrierung	SLP SENS	0.10

Die Retentionszeiten für Coniferylalkohol, Coniferylaldehyd und Ferulasäure waren 4,59; 9,78 bzw. 8,13
Das Chromatogramm ist in der folgenden Abbildung dargestellt.

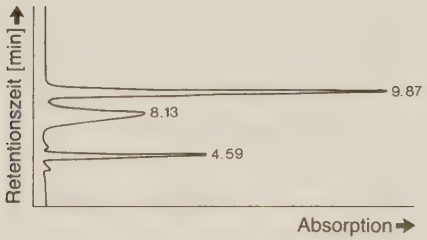


Abb. 5: Elutionsdiagramm von Coniferylalkohol, Coniferylaldehyd und Ferulasäure an einer RP 8 Säule unter den oben genannten Bedingungen.

Parameter, die bei den folgenden Programmen nicht verändert wurden, werden in Tab. 2 nicht mehr aufgezählt. Sie entsprechen den Werten, die auch im Coniferylalkohol-Programm benutzt wurden.

Substanz	Flow (ml/min)	Methanol-anteil (%)	Wellenlänge (Probe-Ref.) (nm)	R_f-Wert (min)
Dehydrodivanillyl-alkohol	2,00	40,0	254 : 430	2,07
Dehydrodivanillin	2,00	40,0	254 : 430	5,60
Dehydrodivanillin-säure	2,00	40,0	254 : 430	2,74 4,07
Guaiacol-Glycerin-Äther	2,00	30,0	276 : 600	5,75
4-Hydroxybenzoe-säure	2,00	30,0	276 : 600	3,16
2-Phenoxybenzoe-säure	2,00	50,0	290 : 600	4,03
4-Hydroxybenzoe-säure	2,00	50,0	290 : 600	1,80
4-Hydroxy-3-Methoxy-Acetophenon	1,50	30,0	280 : 430	7,55
4-Hydroxybenzoe-säure	1,50	30,0	280 : 430	4,03
Homovanillylalko-hol	1,25	30,0	282 : 430	5,04
4-Hydroxybenzoe-säure	1,25	30,0	282 : 430	3,46
Catechol	1,50	20,0	245 : 430	5,36
cis-cis-Mucon-säure	1,50	20,0	245 : 430	3,91
Catechol	2,00	50,0	254 : 430	2,06
Benzoesäure	2,00	50,0	254 : 430	3,40
β-Carboxy-cis-cis-Muconsäure	1,50	34,0	254 : 430	1,84
Protocatechusäure	1,50	34,0	254 : 430	2,86

Tab. 2: Trennprogramme verschiedener Substanzgemische für die Hochdruckflüssigkeitschromatographie

15. Molekulargewichtsbestimmung

Das Molekulargewicht wurde mit einer Sephadex G-200 Säule bestimmt. Zur Kalibrierung der Säule wurden Chymotrypsinogen, Ovalbumin, Rinderserumalbumin, Katalase, Aldolase und Thyroglobulin als Eichsubstanzen benutzt. Mit Thyroglobulin wurde das Leervolumen der Säule bestimmt.
Für jedes Protein wurde der K_{av}-Wert nach der folgenden Formel berechnet:

$$K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o}$$

V_e = Elutionsvolumen
V_o = Säulenleervolumen (=Elutionsvolumen von Thyroglobulin)
V_t = gesamtes Bettvolumen ($r^2 \cdot \pi \cdot h$)

Die K_{av}-Werte für jeden Proteinstandard wurden auf der linearen Ordinate gegen das zugehörige Molekulargewicht auf der logarithmischen Abzisse aufgetragen (Abb. 21).

16. Nachweis von β-Ketoadipinsäure (Rothera-Reaktion)

Die von Rothera (1908) ursprünglich zum Nachweis von Aceton im Harn angewandte Farbreaktion wurde von Kilby (1948, 1951) als Nachweis für β-Ketoadipinsäure benutzt. Der Test spricht allgemein auf Verbindungen mit einer Ketogruppe an, während Aldehyde nicht oder nur in wesentlich höheren Konzentrationen reagieren.

Ammoniumsulfat	100	g
Nitroprussid-Natrium (trocken aufbewahrt)	1	g
Ammoniaklösung, etwa 33 % (d = 0,885)	0,5	ml

Aus Ammoniumsulfat und Nitroprussid-Natrium wurde durch Mörsern ein Trockengemisch hergestellt. 1 g dieses Trockengemischs wurde mit 3 ml der zu prüfenden Lösung vereint und kräftig geschüttelt. Danach wurde dem Ansatz 0,5 ml Ammoniaklösung zugesetzt und abermals gut gemischt.
Bei positiver Reaktion verfärbte sich der Ansatz sofort oder innerhalb von 5 Minuten, je nach Konzentration der reagierenden Substanzen, rot bis violett. Der Farbton ist abhängig von der Art der Ketoverbindung. Die Farbe blieb etwa 1 Stunde stabil.

17. Glucose-Bestimmung

Glucose wurde mit einem Testsystem (System Glucose) der Firma Merck, Darmstadt, quantitativ bestimmt. Im Reaktionsansatz waren 2 ml Reaktionslösung und 0,2 ml Probe enthalten. Die Proben wurden nach dem Mischen 10 - 20 Minuten inkubiert und bei einer Wellenlänge von 366 nm gemessen. Diese Wellenlänge wurde gewählt, um Einflüsse der Ferulasäure bei der Wellenlänge 340 nm weitgehend auszuschalten.

Die Reaktionslösung enthielt:

Glucose-Dehydrogenase (E.C.1.1.1.47.)	5,2 U/ml
Mutarotase (E.C.5.1.3.3.)	0,11 U/ml
NAD^+	1,1 mmol/l
Phosphat-Puffer pH 7,6	0,12 mol/l
Natriumchlorid	0,15 mol/l

18. Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs

Der Sauerstoffverbrauch durch ganze Zellen oder durch Rohextrakt wurde mit einer Clark-O_2-Elektrode der Firma Yellow Springs bestimmt. Das Gesamtvolumen im Reaktionsgefäß betrug 2 ml und enthielt 200 µmol Kalium-Phosphat-Puffer

sowie gewaschene Zellen bzw. Rohextrakt.
Nach der Sättigung des Ansatzes mit Sauerstoff bei 30°C wurde der endogene Sauerstoffverbrauch gemessen und anschließend die Reaktion durch Injektion von 5 µmol des zu testenden Substrats gestartet.
2 ml der gesättigten Lösung enthalten bei 30°C 450 nmol gelösten Sauerstoff (Beechey und Ribbons, 1972).

19. Proteinbestimmungen

Protein wurde nach der Methode von Bensadoun und Weinstein (1976) bestimmt. Es handelt sich um eine modifizierte Lowry Methode. Zu 1 ml der verdünnten Proteinlösung (0-60 g Protein/ml) wurden 10 µl Natrium-Desoxycholat (15 % w/v) und 200 µl Trichloressigsäure (36 % w/v) gegeben. Der entstandene Niederschlag wurde nach 10 Minuten scharf abzentrifugiert und der Überstand vorsichtig dekantiert. Der Niederschlag wurde in 1 ml Lowry-Reagenz und 100 µl Folin-Ciocalteau-Lösung (50 % v/v) aufgenommen. Die Extinktion des Reaktionsansatzes wurde nach 30 Minuten bei der Wellenlänge 660 nm gemessen.

Die Lowry-Reagenzlösung bestand aus den Lösungen

a)	$CuSO_4 \cdot 5\ H_2O$	1 g/100 ml Aqua dest.
b)	Natriumtartrat	2 g/100 ml Aqua dest.
c)	Na_2CO_3	2 g/100 ml 0,1N NaOH

und wurde im Verhältnis 25(a): 25(b): 1(c) jedesmal frisch angesetzt.

Als Schnellmethode wurde zur Überprüfung der Fraktionen aus der Säulenchromatographie auch die Methode nach Bradford (1976) benutzt.

Zu 100 µl einer verdünnten Proteinlösung wurden 5 ml Proteinreagenz gegeben und nach 2 Minuten die Extinktion des Ansatzes bei der Wellenlänge 595 nm gemessen. Die Reagenzlösung war wie folgt zusammengesetzt:

Coomassie-Brillant Blau G-250	100 mg/50 ml Äthanol
Phosphorsäure (85 % v/v)	100 ml
Aqua dest.	850 ml

Der Proteingehalt der Proben wurde bei beiden Methoden anhand einer Eichkurve mit Rinderserumalbumin ermittelt.

20. Bestimmung der reaktionskinetischen Parameter der Coniferylalkohol-Dehydrogenase

Bei verschiedenen Substratkonzentrationen wurde die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit für die verschiedenen Substrate und Coenzyme wie angegeben (II, 8. h) photometrisch bestimmt. Die K_M- und v_{max}-Werte wurden aus dem Lineweaver-Burk Diagramm graphisch ermittelt.

Daneben wurden die reaktionskinetischen Parameter auch mittels eines Computers wie folgt bestimmt.

Die aus dem Reaktionsablauf resultierenden Meßwerte (ΔE), die der Substratkonzentration ($[S]$) proportional sind, wurden als Funktion der Zeit ($[S]=f(t)$) von einem Mikrocomputer aufgenommen, und polynominal angeglichen. Aus dem Differentialkoeffizienten des Polynoms ($\frac{d[S]}{dt}$) wurde die Reaktionsgeschwindigkeit (v) berechnet und von einem XY-Schreiber gegen die angeglichenen Substratkonzentrationswerte aufgezeichnet ($v = f[S]$) (Wichmann und Wandrey 1980). Durch graphische Extrapolation ließ sich daraus die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit für die eingesetzte Substratkonzentration bestimmen.

Die verschiedenen Wertepaare (v_o und [S]) wurden durch nichtlineare Regression der Michaelis-Menten-Beziehung (Briggs und Haldane, 1925)

$$v = \frac{v_{max} \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

rechnerisch angepaßt.
In bestimmten Fällen ergab die Formel

$$v = \frac{v_{max} \cdot [S]}{K_M + \frac{[S] \cdot [S]}{K_I + [S]}}$$

eine bessere Anpassung, demzufolge dann Substrat-Inhibition vorlag. Aus diesen angeglichenen Kurven wurden mittels des Computers die reaktionskinetischen Parameter bestimmt.

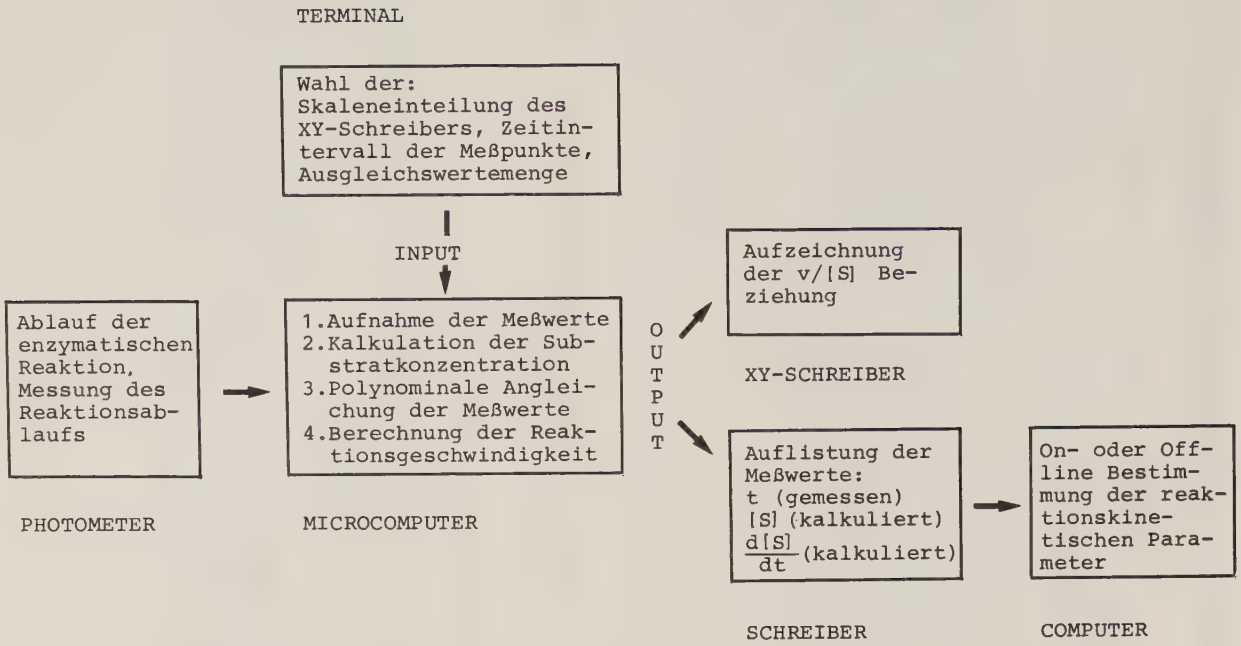


Abb. 6: Fließschema des Versuchsaufbaus zur Bestimmung der reaktionskinetischen Parameter.

21. Herstellung von nicht käuflichen Substanzen

a) Coniferylaldehyd

Da Coniferylaldehyd nicht im Handel erhältlich ist, wurde diese Substanz mikrobiell selbst hergestellt.
Kulturmedium mit 0,5 g/l Coniferylalkohol wurde, wie oben beschrieben, mit einer gewaschenen Vorkultur von *R.erythropolis* beimpft und ca. 60 Stunden inkubiert, bis der Coniferylalkohol fast quantitativ zu Coniferylaldehyd oxidiert war. Die Oxidation wurde mittels der Hochdruckflüssigkeitschromatographie verfolgt. Zu diesem Zeitpunkt wurde die Kultur abgebrochen, die aromatischen Substanzen aus dem Kulturfiltrat extrahiert und nach Einengung dünnschichtchromatographisch in ihre Bestandteile aufgetrennt. Die Coniferylaldehyd Fraktion (UV-Nachweis) wurde von der Platte ausgekratzt und durch mehrmaliges Waschen des Kieselgels mit Methanol extrahiert. Die vereinten Methanol-Überstände wurden bis zur Trockne eingeengt.
Die Ausbeute an Coniferylaldehyd betrug etwa 60 % des eingesetzten Coniferylalkohols.

b) Präparation von DHP

Zur Präparation des Dehydropolymers aus Coniferylalkohol wurde die "Zutropfmethode", wie bei Freudenberg (1968) beschrieben, benutzt.
Bei dieser Methode wird Coniferylalkohol durch Peroxidase und Wasserstoffperoxid (H_2O_2) oxidiert, was zur spontanen Polymerisation der entstandenen Radikale führt. Das so hergestellte künstliche Polymer ist natürlichem Lignin sehr ähnlich (Freudenberg, 1968; Nimz et al., 1974).

Folgende Lösungen wurden angesetzt:

Coniferylalkohol	13 mg/0,4 ml	Äthanol
Peroxidase	1,2 mg/9 ml	steriles Wasser
H_2O_2 (30 %)	0,16 ml/4 ml	steriles Wasser

Coniferylalkohol und Peroxidase wurden vereint und H_2O_2 langsam über mehrere Stunden unter Rühren zugetropft. Die entstandene Suspension wurde 2 Tage in der Kälte (4°C) aufbewahrt und anschließend abzentrifugiert. Nach zweimaligem Waschen mit sterilem Wasser wurde die Suspension lyophilisiert. Das DHP-Lyophilisat wurde für Tests in Dimethylformamid gelöst.

III. ERGEBNISSE

1. Ermittlung geeigneter Kulturbedingungen

In früheren Arbeiten mit *R.erythropolis* (Trojanowski et al., 1977; Gradziel et al., 1978) wurde der Organismus auf einem Medium mit Hefeextrakt angezogen. Um aber regulatorische Einflüsse durch nicht näher analysierbare Substanzen im Hefeextrakt auszuschließen, wurden zunächst Wachstumsversuche mit synthetischen Medien durchgeführt.

In den folgenden Experimenten wurde der Einfluß der Spurensalz- und Vitaminquelle, der Stickstoffquelle und der Inkubationstemperatur untersucht. Als vergleichbare Parameter dienten bei diesen Optimierungsversuchen die Wachstumsrate, die gebildete Biomasse und die Aktivität der Protocatechuat-3,4-Dioxygenäse. Das Basismedium enthielt KH_2PO_4 (0,4 g/l), K_2HPO_4 (1,6 g/l), NH_4NO_3 (0,5 g/l), $MgSO_4$ (0,2 g/l), Fe-EDTA (5 mg/l) und Protocatechusäure (0,5 g/l) als Kohlenstoffquelle. Zu dieser Salzlösung wurden verschiedene Vitamine, Spurensalze oder eine Kombination aus einer Spurenelementlösung und einer Vitaminlösung gegeben. Zum Vergleich wurde eine Kultur mit Hefeextrakt als Supplement benutzt. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle dargestellt.

Zusätze	μ_{max} (h^{-1})	$Y^{max}_{x/s}$	lag-Phase (h)	Protocatechuat-3,4-Dioxygenase (µmol/min · mg)
Hefeextrakt (100 mg/l)	0,15	0,50	6	0,32
Biotin Thiamin Riboflavin Nicotinsäure (je 10 mg/l)	0,13	0,46	6	0,30
Biotin Thiamin (je 10 mg/l)	0,11	0,46	6	0,34
Biotin Thiamin (je 10 mg/l) Spurensalze (Ca, Cu, K, Mn, Zn, B)	0,23	0,48	22	0,33
Spurensalze (Ca, Cu, K, Mn, Zn, B)	0,18	0,48	6	0,33

Tab. 3: Wachstumsrate, Zellausbeute, Dauer der lag-Phase und Aktivität der Protocatechuat-3,4-Dioxygenase in Abhängigkeit der Zusätze zum Basismedium.

Aus der Tabelle geht hervor, daß die Zellausbeute in den unterschiedlichen Medien gleich, die maximalen Wachstumsraten aber sehr unterschiedlich waren. Die geringste Wachstumsrate wurde mit den Vitaminen Biotin und Thiamin erreicht. Dagegen war die Wachstumsrate auf Biotin und Thiamin in Verbindung mit der Spurensalzlösung sogar höher als mit Hefeextrakt als Zusatz. Da aber in dieser Kombination eine ausgeprägte lag-Phase auftrat, wurde das Basismedium mit der Spurensalzlösung als die geeigneteste Wachstumsgrundlage ausgewählt.

Der Einfluß der Stickstoffquelle wird in Abb. 7 dargestellt. Die Wachstumskurven wurden mit NH_4NO_3, KNO_3, NH_4Cl und $(NH_4)_2SO_4$ als Stickstoffquelle aufgenommen. Die Konzentrationen, bezogen auf Stickstoff, waren in allen Ansätzen gleich (0,09 g/l).

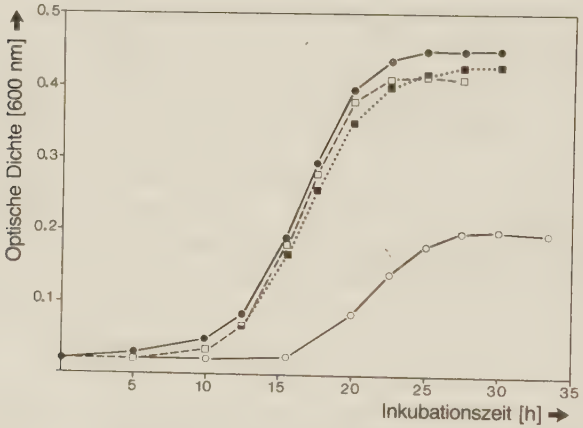


Abb. 7: Wachstumskurven mit verschiedenen Stickstoffquellen NH_4NO_3(●——●); KNO_3(○——○); NH_4Cl (□- -□); $(NH_4)_2SO_4$(■·····■)

Der Vergleich der Wachstumskurven zeigt, daß für Ammonium-Stickstoff die Wachstumsraten und die erreichten Zelldichten identisch waren. Nitrat-Stickstoff ermöglichte dagegen ein wesentlich geringeres Wachstum.
Die gewählte Konzentration von 0,09 g/l Stickstoff war nicht limitierend, da die Wachstumskurve mit 10facher NH_4NO_3-Konzentration keinen Unterschied zu den anderen zeigte.

Der Einfluß der Inkubationstemperatur wurde bei 25°C, 27°C, 30°C und 33°C untersucht. Als Wachstumsmedium wurde den vorherigen Versuchen entsprechend, Basismedium mit der Spurensalzlösung, NH_4NO_3 und Protocatechusäure verwandt.

Wie aus Abb. 8 zu ersehen ist, war das Wachstum bei Inkubationstemperaturen unter 27°C und über 30°C deutlich verzögert.

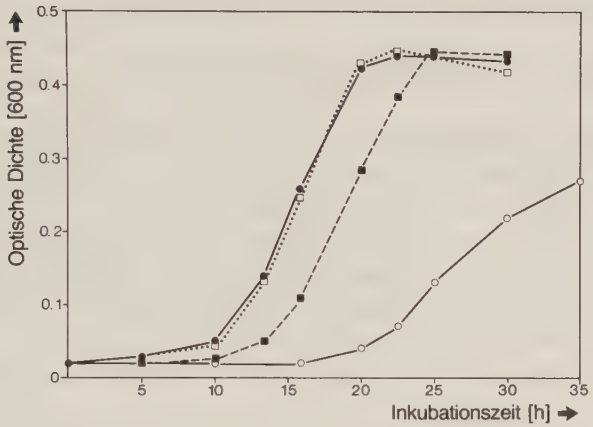


Abb. 8: Wachstumskurven bei verschiedenen Inkubationstemperaturen 25°C(■—■);27°C(□·····□);30°C(●——●);33°C(○——○)

2. Wachstum auf verschiedenen Kohlenstoffquellen und Umwandlung von Aromaten

Bei der Synthese des Holzes werden zwischen den Phenylpropaneinheiten des Lignins verschiedene C-C- und Äther-Bindungen ausgebildet und die Zellwandkohlenhydrate der Pflanze über Äther-Brücken mit dem Lignin verbunden (Abb. 2). Beim Wachstum auf nativem Lignin ist somit die Fähigkeit des Organismus zur Verwertung dieser Polysaccharide und deren Bausteine sowie die Spaltung der intermonomeren Bindungstypen von Bedeutung. Da Veränderungen bezüglich der Bindungstypen im komplexen Lignin - Molekül nur sehr schwer erfaßbar sind, wurde von mehreren Autoren der Abbau

niedermolekularer Ligninmodellkomponenten beschrieben (Kirk et al., 1968; Fukuzumi et al., 1969). In dem folgenden Kapitel wird zum Studium enzymatischer Reaktionen, die Verwertung und Umwandlung niedermolekularer Aromaten und verschiedener Kohlenhydrate untersucht.

a) Wachstum auf verschiedenen Kohlenhydraten

In mehreren Arbeiten wurde beschrieben, daß Cellulose und Glucose den Abbau von Lignin beeinflussen. So zeigten Kirk et al. (1976) und Hiroi und Eriksson (1976), daß verschiedene Weißfäulepilze Lignin nur in Gegenwart einer leicht verwertbaren Kohlenstoffquelle wie Glucose oder Cellulose abbauen können. Odier und Monties (1978) stellten aber bei einem Bakterienstamm der Gattung *Xanthomonas* fest, daß der Ligninabbau durch Glucose sogar unterdrückt wird.
Mit dem in dieser Arbeit benutzten Stamm zeigten Trojanowski et al. (1977), daß die $^{14}CO_2$-Freisetzung aus Lignocellulose von Mais höher war, als aus synthetischem DHP. Wie sie vermuteten, könnte der Grund die Anwesenheit von Zellwandkohlenhydraten oder die bessere Verwertbarkeit des Maislignins sein.
Es wurde deswegen geprüft, inwieweit *R.erythropolis* überhaupt in der Lage ist, Poly-, Di- und Monosaccharide zu verwerten. Die vorliegenden Untersuchungen ergaben, daß weder die getesteten Polysaccharide Carboxymethyl-Cellulose, Solka-Floc und Xylan noch das Disaccharid Cellobiose zum Wachstum benutzt werden konnte. Auch die Monosaccharide Xylose, Mannose und Lactose konnte der Organismus nicht verwerten. Glucose dagegen erlaubte ein den aromatischen Kohlenstoffquellen vergleichbares Wachstum.
In Verbindung mit den Befunden von Trojanowski et al. (1977) könnte dies bedeuten, daß natives Lignin für *R.erythropolis* besser zugänglich ist als synthetisches Lignin.

b) Wachstum auf monomeren Aromaten

Die in Tab. 4 aufgeführten aromatischen Substanzen, wurden als Kohlenstoff- und Energiequelle getestet. Darunter sind Abbauprodukte, die bei der mikrobiellen Zersetzung des Lignins gefunden wurden (Coniferylaldehyd, Ferulasäure, Vanillin, Vanillinsäure und 4-Hydroxybenzoesäure) (Cain, 1980) und methoxylierte und hydroxylierte Derivate dieser Aromaten.
Inwieweit eine Beziehung zwischen dem Abbau des wasserunlöslichen Polymers und der Verwertung dieser monomeren Bausteine besteht, ist bisher nicht geklärt worden. Jedoch ist bekannt, daß alle Organismen, die Lignin oxidieren auch niedermolekulare Aromaten verwerten können, was umgekehrt nicht zutrifft (Haider und Trojanowski, 1975; Sparnins und Dagley, 1975; Gradziel et al., 1978; Crawford und Crawford, 1980).
Die Reaktionen, wie Demethoxylierung, Hydroxylierung, Ringspaltung und Oxidation der Seitenkette, die bei monomeren Aromaten stattfinden, sind auch beim Ligninabbau festgestellt worden. Durch Untersuchungen über den Abbau monomerer Bausteine können daher Erkenntnisse über enzymatische Mechanismen gewonnen werden, die eventuell auch beim Ligninabbau selbst von Bedeutung sind.

Substrat	Wachstum	Substrat	Wachstum
Coniferylalkohol	+	2,6-Dimethoxybenzoesäure	+
Coniferylaldehyd	+	3,4,5-Trimethoxybenzoesäure	-
Ferulasäure	+	Benzoesäure	+
Sinapinsäure	-	4-Hydroxybenzoesäure	+
Protocatechusäure	+	3-Hydroxybenzoesäure	+
2,4-Dihydroxybenzoesäure	+	Gentisinsäure	+
3,5-Dihydroxybenzoesäure	-	Syringasäure	-
3,4-Dihydroxybenzaldehyd	-	Catechol	+
Vanillinsäure	+	Guaiacol[1)]	-
Vanillin	+	Phenol	+
3,5-Dimethoxybenzoesäure	+	3-Methoxyphenol	-
3,4-Dimethoxybenzoesäure	+	4-Methoxyphenol	+

Tab: 4: Verschieden substituierte aromatische Substanzen, die als Wachstumssubstrat für *R.erythropolis* getestet wurden.

[1)] für Guaiacol konnte eine positive Mutante des Wildtyps isoliert werden

Aromaten, die drei benachbarte Substituenten trugen, wie Sinapinsäure, 3,4,5-Trimethoxybenzoesäure oder Syringasäure, wurden nicht abgebaut.
Insgesamt zeigte der Organismus jedoch ein breites Spektrum verwertbarer Substanzen.

Wie Eggeling und Sahm (1980) mit verschiedenen Mutanten nachgewiesen haben, erfolgt der Abbau von Coniferylalkohol bei *R.erythropolis* durch Oxidation über Vanillinsäure und Protocatechusäure.
Eine nähere Untersuchung mittels HPLC ergab, daß Coniferylalkohol zunächst fast quantitativ zu Coniferylaldehyd oxidiert und im Kulturfiltrat angehäuft wurde, was mit einer gelben Verfärbung des Mediums verbunden war. Gleichzeitig wurde im Kulturfiltrat auch die Bildung einer geringen Menge

Ferulasäure gefunden. Erst nach einer lag-Phase von 130 Stunden wuchs der Organismus exponentiell und erreichte dabei eine Wachstumsrate wie auf anderen Substraten (Abb. 9). Bei der Verwertung von Coniferylalkohol scheint somit die Oxidation des Coniferylaldehyds zu Ferulasäure reaktionslimitierend zu sein.

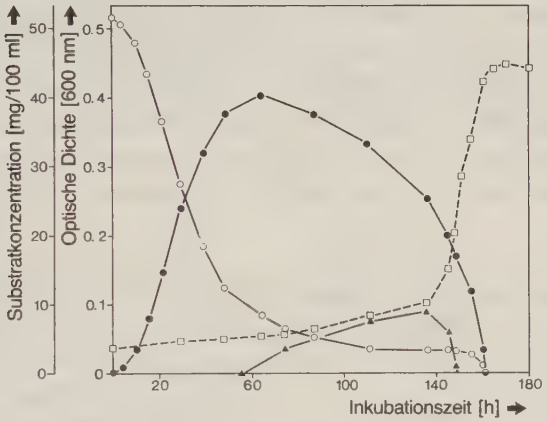


Abb. 9: Wachstumskurve (□---□) und Umsatzrate von Coniferylalkohol (○——○) zu Coniferylaldehyd (●——●) und Ferulasäure (▲——▲) in einer Kultur mit *R. erythropolis*.

c) Umwandlung von Aromaten mit ligninähnlichen Bindungen

Bei Bakterien wurde die Fähigkeit zur Spaltung einer Arylglycerol-β-Aryl Äther Bindung, die den häufigsten intermonomeren Bindungstyp im Lignin darstellt, von Crawford et al. (1973 b) beschrieben. Sie isolierten einen nicht näher charakterisierten *Pseudomonas*-Stamm, der auf Veratrylglycerol-β-(o-Methoxyphenyl)-Äther als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle wuchs.

Die Oxidation derartiger Ligninmodellsubstanzen wurde auch bei weiteren Bakerien der Gattung *Pseudomonas* (Kawakami, 1975 a, 1975 b; Fukuzumi und Katayama, 1977) und der Gattung Acinetobacter (Crawford,1975 b) beobachtet.

Bei *R.erythropolis* wurde untersucht, ob Aryl-Aryl-, Aryl-Alkyl- oder Aryl-Äther Bindungen, die Modellcharakter für verschiedene Bindungstypen im Ligninmolekül besitzen, gespalten werden. Die folgende Abbildung zeigt die Beziehung zwischen Strukturelementen des Lignins und den untersuchten einfachen aromatischen Substanzen.

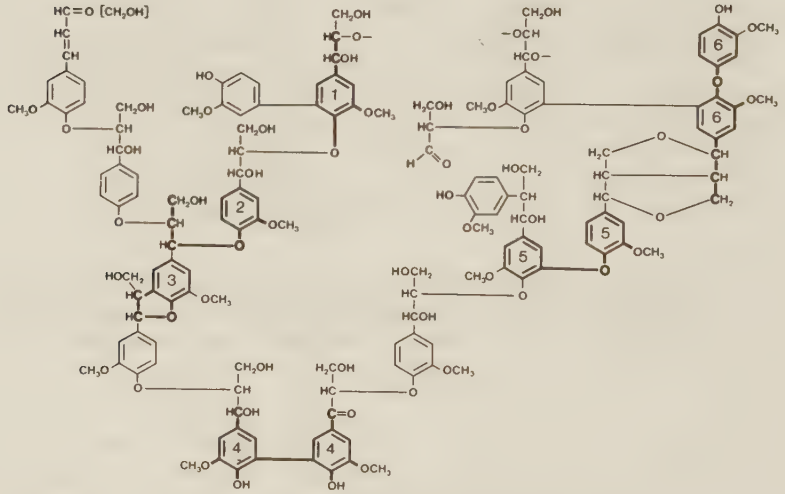


Abb. 10: In dem komplexen Ligninmolekül sind die Strukturelemente, die die getesteten Substanzen repräsentieren, hervorgehoben.
1. 2-(4-Hydroxy-3-Methoxyphenyl)-Äthanol (= Homovanillylalkohol); 2. Guaiacolglycerylläther; 3. Cumaran; 4. Dehydrodivanillin; 5. 2-Phenoxybenzoesäure;6. Isoeugenolbenzyläther

Der Organismus konnte mit den getesteten Aromaten (Cumaran, Cumaron, Isoeugenolbenzyläther, Guaiacolglyceryläther, 2-Phenoxybenzoesäure, 4-Hydroxy-3-Methoxyacetophenon, 2-(4-Hydroxy-3-Methoxyphenyl)-Äthanol, α-Phenoxypropiophenon, Dehydrodivanillin) als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle nicht wachsen. Auch in Verbindung mit Glucose (0,5 g/l), 4-Hydroxybenzoesäure (0,5 g/l) oder Äthanol (1,2 % v/v) wurde keine größere Biomasse gebildet als beim Wachstum auf diesen Cosubstraten alleine.
Cumaran und Cumaron hemmten in einer Konzentration von 0,3 g/l sogar das Wachstum des Organismus auf 4-Hydroxybenzoesäure.
Nur im Fall von Dehydrodivanillin wurde mittels der HPLC und der Dünnschichtchromatographie eine Veränderung beobachtet. Die anderen Testsubstanzen wurden nicht oxidiert (Tab. 5).

Zur näheren Untersuchung der Verwertung von Dehydrodivanillin wurden Experimente in einem 1,8 l Fermenter mit pH-Regelung bei pH 7,5 durchgeführt, da Dehydrodivanillin erst bei pH 7,5 löslich ist.
In der Kultur mit dem Dimer als einzigem Substrat wurde entsprechend den Schüttelkolbenversuchen weder eine Vermehrung der Zellen noch ein Abnahme oder Veränderung des Dehydrodivanillins beobachtet. Erst bei Zugabe eines leicht verwertbaren zweiten Substrats,wie Glucose oder 4-Hydroxybenzoesäure wurde Wachstum und einhergehend damit eine Abnahme des Dehydrodivanillins festgestellt. Nach dem Verbrauch des Wachstumssubstrats wurde dieselbe Zellausbeute erreicht, wie allein beim Wachstum auf Glucose oder 4-Hydroxybenzoesäure. Das Dimer konnte also nicht zum Wachstum genutzt werden und wurde offensichtlich nur teilweise oxidiert. Im Einklang damit wurde parallel zur Abnahme des Dehydrodivanillins die Bildung einer neuen Substanz nachgewiesen.

Durch eine erneute Zugabe von Glucose oder 4-Hydroxybenzoesäure konnte der Umsatz von Dehydrodivanillin aufrechterhalten werden. Erst nach 20 Tagen Inkubation und 4 Cosubstrat-Shifts war das Dimer quantitativ umgelagert (Abb. 11).

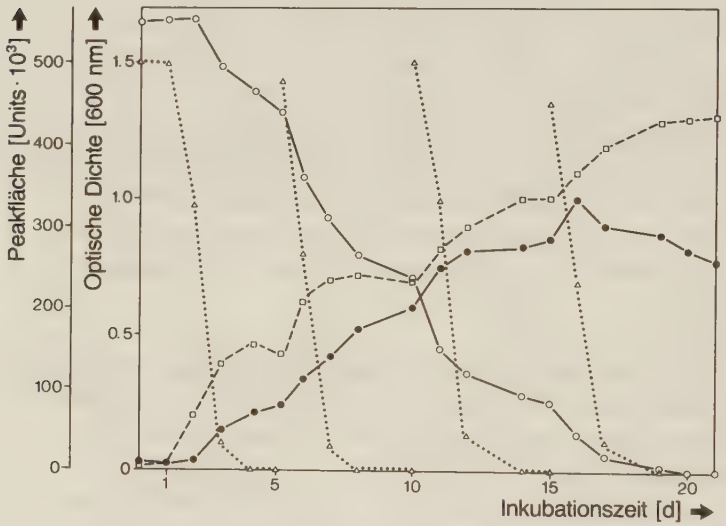
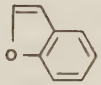
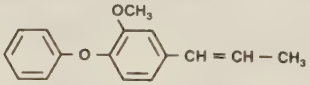
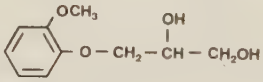
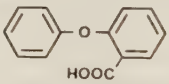
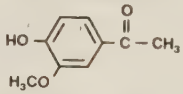
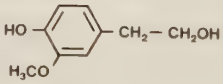
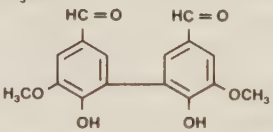
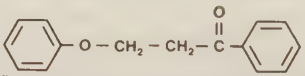


Abb. 11: Umsatzrate von Dehydrodivanillin (○——○) durch eine auf 4-Hydroxybenzoesäure (△·····△) wachsende Kultur von *R.erythropolis* (●——●). Die Zunahme der neu gebildeten Substanz ist durch die Symbole (□– – –□) gekennzeichnet.
Eine Kultur mit Glucose als Cosubstrat hatte den gleichen Verlauf.

Bei der HPLC (reversed-phase)-Auftrennung besaß unter den angegebenen Trennbedingungen der Peak der unbekannten Substanz einen kleineren R_f-Wert als Dehydrodivanillin. Das bedeutet, daß die neu entstandene Verbindung polarer ist als die Ausgangssubstanz. Die unbekannte Substanz wurde bezüglich ihres R_f-Wertes und ihres UV-Absorptionspektrums mit Dehydrodivanillylalkohol, Dehydrodivanillin und Dehydrodivanillinsäure im Hochdruckflüssigkeitschromatographen verglichen. Es konnte in keinem Fall eine Übereinstimmung ge-

funden werden. Dies bestätigten auch zusätzlich durchgeführte dünnschichtchromatographische Trennungen.
Im Laufmittel Benzol-Methanol-Essigsäure (90:18:9) wurden die Dimere von der unbekannten Substanz getrennt. Durch eine Dünnschichtchromatographie mit dem Laufmittel Butanol-Wasser (88:12) konnte ferner gezeigt werden, daß der unbekannte Substanzfleck auch nicht mit den monomeren Vanillylalkohol, Vanillin und Vanillinsäure identisch war (Abb. 12a und b). Bei Besprühen der Dünnschichtchromatogramme mit 3,4-Dinitrophenylhydrazin reagierte der Substanzfleck positiv, so daß angenommen werden kann, daß die unbekannte Substanz noch Aldehydcharakter besitzt.

Die positive Aldehydreaktion und die Dünnschichtchromatogramme deuten darauf hin, daß vermutlich kein Angriff auf die Aldehydgruppe und auf die intermonomere Bindung erfolgte. Der polare Charakter der Substanz spricht aber dafür, daß entweder zusätzliche Hydroxylgruppen eingeführt worden sind oder Methoxylgruppen durch diese ersetzt wurden. Wie Eggeling und Sahm (1978) beschrieben haben, entsteht beim Wachstum auf Vanillinsäure Formaldehyd, wobei eine Formaldehyd-Dehydrogenase induziert wird. Es wurde daher geprüft, ob auch ganze Zellen aus dem Ansatz mit Dehydrodivanillin und Glucose Formaldehyd oxidieren können. Dieser Versuch wurde mit einer Sauerstoffelektrode durchgeführt, und es konnte festgestellt werden, daß bei Zugabe von Formaldehyd die Zellen sofort Sauerstoff aufnahmen. Zum Vergleich wurden auch Zellen getestet, die auf Glucose gewachsen waren. Sie besaßen diese Fähigkeit nicht.
Dies ist ein Indiz dafür, daß sehr wahrscheinlich die Methoxylgruppe des Dehydrodivanillins abgespalten wurde. Massenspektroskopische Untersuchungen dieser Substanz bestätigen diese Vermutung. Weitere chemische Analysen sollen aber letzten Aufschluß über die Struktur der Substanz geben.

Substrat	Strukturformel	Wachstum in Anwesenheit eines Cosubstrats ($O D_{600}$)
Cumaran		0,336 nach 3 Tagen mit 4-Hydroxybenzoesäure
Cumaron		0,350 nach 6 Tagen mit 4-Hydroxybenzoesäure
Isoeugenolbenzyläther		0,155 nach 3 Tagen mit Äthanol
Guaiacolglyceryläther		0,500 nach 28 Stunden mit 4-Hydroxybenzoesre.
2-Phenoxybenzoesäure		0,520 nach 28 Stunden mit 4-Hydroxybenzoesre.
4-Hydroxy-3-Methoxyacetophenon		0,495 nach 28 Stunden mit 4-Hydroxybenzoesre.
2-(4-Hydroxy-3-Methoxyphenyl)-Äthanol		0,498 nach 28 Stunden mit 4-Hydroxybenzoesre.
Dehydrodivanillin		0,480 nach 28 Stunden mit 4-Hydroxybenzoesre.
α-Phenoxypropiophenon		0,480 nach 28 Stunden mit 4-Hydroxybenzoesre.

Tab. 5: Ergebnisse aus den Wachstumsversuchen von *R.erythropolis* mit verschiedenen Substraten, die dem Ligninmolekül vergleichbare Äther- und C-C-Bindungen enthalten.

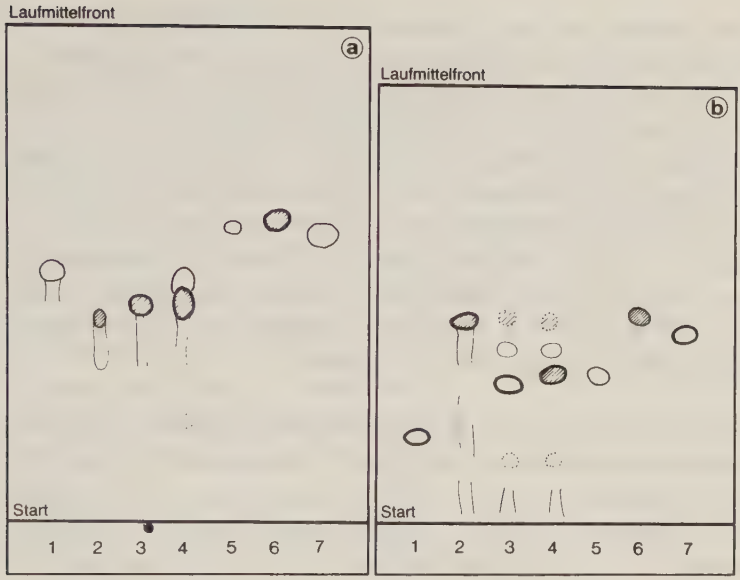


Abb. 12 a und b: Dünnschichtchromatogramme der extrahierten Proben mit Benzol-Methanol-Essigsäure (90:16:8) (Abb. 12 a) und Butanol-Wasser (88:12) (Abb. 12 b) als Laufmittel.
Die Schraffierung gibt die Intensität der Aldehydfärbung an. Die Testsubstanzen wurden in der Reihenfolge 1. Dehydrodivanillylalkohol, 2. Dehydrodivanillin, 3. Dehydrodivanillinsäure, 4. Probe, 5. Vanillylalkohol, 6. Vanillin, 7. Vanillinsäure aufgetragen.

3. Isolierung der Coniferylalkohol-Dehydrogenase

Bakterielle Alkoholdehydrogenasen, die jedoch bevorzugt die Umsetzung aliphatischer Substrate katalysieren, sind bekannt. Verschiedene aromatische Alkoholdehydrogenasen wurden von Katagiri et al. (1967) und Keat und Hopper (1978) aus *Pseudomonas spec.* und *Pseudomonas putida* isoliert.

Diese Enzyme sind NAD^+ abhängig und katalysieren die Oxidation verschieden substituierter Benzylalkohole. Eine für Coniferylalkohol spezifische Dehydrogenase wurde bisher bei Bakterien noch nicht beschrieben.
Der Abbau von Coniferylalkohol über Coniferylaldehyd, der zwischenzeitlich angereichert wird, deutet auf eine Coniferylalkohol-Dehydrogenase bei *R.erythropolis* hin. Im Rohextrakt dieser Zellen konnte auch eine entsprechende Dehydrogenase Aktivität nachgewiesen werden. Ferner wurde in Vanillinsäure und Ferulasäure gewachsenen Zellen eine vergleichbar hohe Aktivität gemessen.

Zur Anreicherung des Enzyms aus dem Rohextrakt wurden Zellen in einem Fermenter auf Ferulasäure angezogen, da Ferulasäure gegenüber Coniferylalkohol ein günstiges und billiges Wachstumssubstrat ist. Aus einer Fermenterkultur von 9 l konnten ca. 22 g Zellen (Naßgewicht) geerntet werden.

a) Ammoniumsulfatfällung

Ungefähr 10 g Zellen (Naßgewicht) wurden in gefrorenem Zustand mittels einer X-Presse aufgeschlossen. Dem zellfreien Rohextrakt (69 ml), mit einem Proteingehalt von ca. 11 mg/ml, wurde langsam unter Rühren Ammoniumsulfat bis zur 50 %igen Sättigung zugegeben und nach zweistündiger Gleichgewichtseinstellung das Präzipitat durch Zentrifugation (30 min, 48 000 g) entfernt. Der klare Überstand wurde auf eine 70 %ige Ammoniumsulfatsättigung gebracht und das gefällte Protein nach 2 Stunden abzentrifugiert. Das Protein wurde in ca. 2 ml 10 mM Kalium-Phosphat-Puffer aufgenommen und gegen den gleichen Puffer dialysiert. Hinsichtlich der Aktivität war in dieser Fraktion jedoch nur noch 37 % der Ausgangsaktivität enthalten (Tab. 6).

b) präparative Gelelektrophorese

Die weitere Reinigung des Enzyms wurde direkt mittels präparativer Polyacrylamidgel-Elektrophorese durchgeführt. Ein 5 mm dickes Gel, daß nach der Methode von Maurer (1971) hergestellt wurde, wurde mit maximal 40 mg vorgereinigtem Protein beladen. Die Lage der Coniferylalkohol-Dehydrogenase konnte nach einer modifizierten Methode nach Skyring et al. (1970) auf dem Gel sichtbar gemacht werden. Dieser Bereich wurde ausgeschnitten und mit Aqua dest. eluiert. Das Eluat wurde vom Gel durch Zentrifugation getrennt und auf seine Aktivität hin untersucht. Da die gemessene Aktivität jedoch nur noch wenige Prozent der Ausgangsaktivität betrug, scheint die Reinigung mittels dieser Methode nicht geeignet zu sein.

Anreicherungs-schritt	Volumen (ml)	Gesamt-protein (mg)	Gesamt aktivität (U)	spez. Aktivität (U/mg)	Ausbeute (%)
Rohextrakt	69	720,8	340	0,47	100
$(NH_4)_2SO_4$ 50-70 %ige Sättigung	3	72,4	127,1	1,47	37,4
Gelelektrophorese	2,2	1,6	0,68	0,43	0,2

Tab. 6: Anreicherung der Coniferylalkohol-Dehydrogenase über fraktionierte Ammoniumsulfatfällung und präparative Gelelektrophorese aus dem Rohextrakt von *R.erythropolis*.

c) DEAE-Cellulose-Chromatographie

Maximal 150 ml Rohextrakt, der über Nacht gegen 10 mM Kalium-Phosphat-Puffer pH 7,5 mit 0,175 M NaCl und 0,01 % Natriumazid dialysiert worden war,wurden auf eine mit gleichem Puffer äquilibrierte DEAE-Cellulose Säule gegeben. Nachdem kein

Protein mit dem Waschpuffer mehr ausgewaschen wurde, konnte durch einen linearen NaCl-Gradienten die Coniferylalkohol-Dehydrogenase eluiert werden (Abb. 13). Die Fraktionen Nr. 325 - 352 (140 ml) wurden vereint, über Kollodiumhülsen (Merck) auf 6,4 ml eingeengt und bezüglich ihres Proteingehalts und ihrer Aktivität getestet (Tab. 7). Die Ausbeute an Enzymeinheiten betrug 80 % bei einer 18,2fachen Anreicherung.

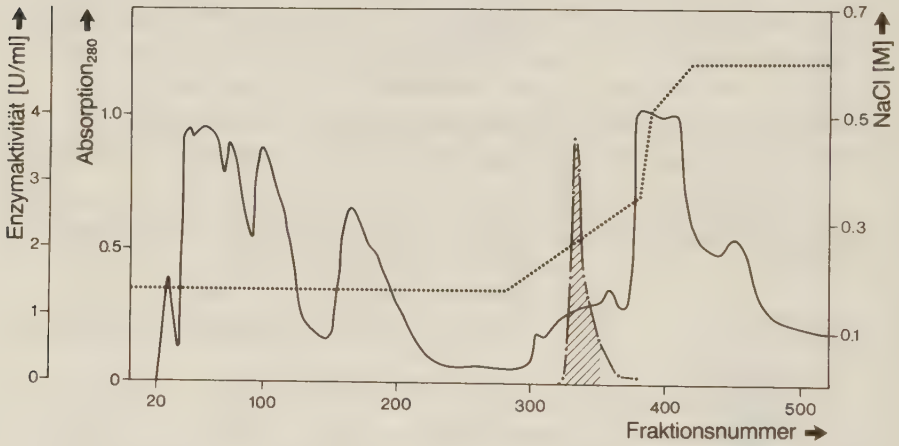


Abb. 13: Chromatographie der Coniferylalkohol-Dehydrogenase an DEAE-Cellulose. Das Enzym wurde mit einem lineraren NaCl-Gradienten (0,175 - 0,35 M) eluiert. (———) Absorption bei 280 nm, (—·—·—) Enzymaktivität, (·····) NaCl-Gradient. Der schraffierte Bereich zeigt die vereinten Fraktionen.

Als folgender Schritt wurde eine für NAD^+-abhängige Enzyme spezifische Affinitätschromatographie an Blue-Sepharose CL-6B durchgeführt. Da die Coniferylalkohol-Dehydrogenase nicht gebunden wurde, konnte aber damit keine nennenswerte Anreicherung erzielt werden.

d) Chromatographie an Biogel A 1,5

5 ml der konzentrierten, vereinten Fraktionen aus der DEAE-Cellulose-Chromatographie wurden nach 16stündiger Dialyse und nach Äquilibrierung der Säule aufgetragen.
29,3 ml (Fraktionen 130 - 142) wurden vereint und auf 3,4 ml eingeengt. An der Biogel A 1,5 Säule konnte eine 31fache Anreicherung bezogen auf den Rohextrakt und eine fast 74 %ige Ausbeute erzielt werden (Abb. 14; Tab. 7).

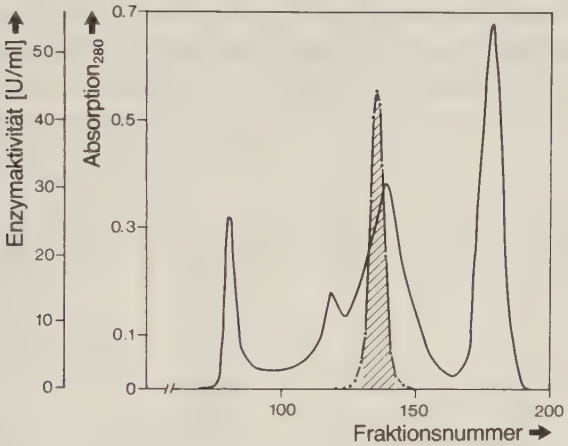


Abb. 14: Elutionsdiagramm der Gelfiltration an Biogel A 1,5 mit 10 mM Kalium-Phosphat-Puffer pH 7,5 und 0,01 % Natriumazid
(———) Absorption bei 280 mm, (—·—·—) Oxidation von Coniferylalkohol
Der schraffierte Bereich zeigt die vereinten Fraktionen.

e) Chromatographie an Hydroxylapatit

Das eingeengte Eluat der vereinten Fraktionen aus der Agarose-Säule (Biogel A 1,5) wurde nach 16stündiger Dialyse gegen 5 mM Kalium-Phosphat-Puffer pH 7,5 auf eine Hydroxylapatit-Säule ,

die mit dem gleichen Puffer äquilibriert war, aufgetragen und gewaschen. Das Enzymprotein wurde nicht an das Säulenmaterial gebunden, so daß die Coniferylalkohol-Dehydrogenase Aktivität schon im Leervolumen erschien.
Ähnlich verhielt sich auch eine Zimtalkohl-Dehydrogenase, die Wyrambik und Grisebach (1975) aus Sojabohnen isolierten, bei der Trennung an Hydroxylapatit.
Bezüglich des vorangegangenen Reingungsschritts an Agarose wurde an Hydroxylapatit eine 2,1fache Anreicherung der Coniferylalkohol-Dehydrogenase erreicht. Die Ausbeute betrug jedoch nur 33 % der aufgetragenen Aktivität (Abb. 15; Tab.7). 45 ml der vereinten aktiven Fraktionen (Nr. 7 - 15) wurden auf 5 ml über Kollodiumhülsen eingeengt und in tiefgefrorenem Zustand bei - 20°C oder bei 4°C mit Dimercaptoäthanol aufbewahrt.

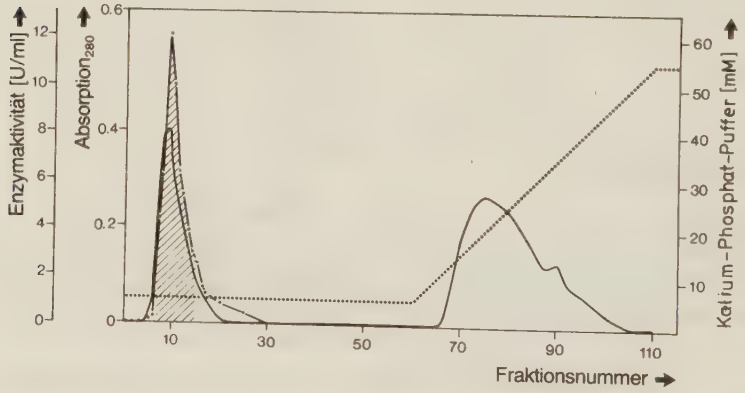


Abb. 15: Elutionsdiagramm der Chromatographie an Hydroxylapatit.
(————) Absorption bei 280 nm, (—·—·—) Enzymaktivität, (·····) Kalium-Phosphat Gradient (5 - 55 mM). Die vereinten Fraktionen sind schraffiert hervorgehoben.

f) Chromatographie an Sephadex G-200

Die eingeengten Fraktionen der Hydroxylapatit-Chromatographie wurden über Nacht gegen 10 mM Tris-HCl-Puffer pH 7,2 mit 100 mM NaCl, 10 mM Dimercaptoäthanol und 0,02 % Natriumazid dialysiert und auf eine Sephadex G-200 Säule aufgetragen. Mit Hilfe dieser Methode wurde nochmals eine 18,5fache Anreicherung bezogen auf die Reinigung an Hydroxylapatit erreicht. Die verbliebene Aktivität betrug 14,3 % der Ausgangsaktivität (Abb. 16; Tab. 7). Die vereinten aktiven Fraktionen (Nr. 54 - 59; 27,6 ml) wurden bei 4°C aufbewahrt und in entsprechender Verdünnung für die folgenden Charakterisierungsschritte verwandt.

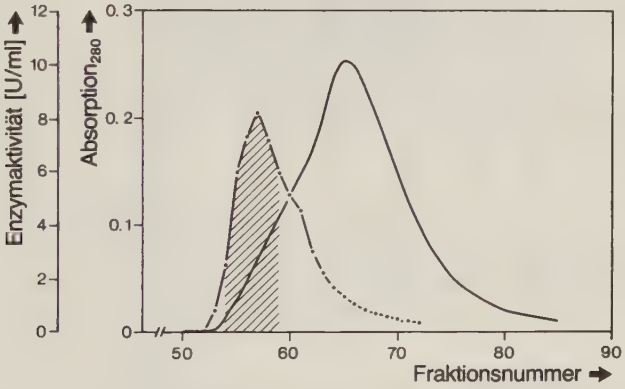


Abb. 16: Elutionsdiagramm der Chromatographie an Sephadex G-200 (———) Absorption bei 280 nm, (—·—·—) Enzymaktivität. Die Fraktionen 54-59 (schraffierter Bereich) wurden vereint.

Die zur Anreicherung notwendigen Reinigungsschritte sind in Abb. 17 und in der folgenden Tabelle gegenübergestellt.

Anreicherungs-schritt	Volumen (ml)	Gesamt-protein (mg)	Gesamt-aktivität (U)	spezifische Aktivität (U/mg)	Ausbeute (%)	Anreicherung
Rohextrakt	160	1.824,0	928,6	0,54	100	1
DEAE-Cellulose	6,4	85,8	794,3	9,3	80,0	18,2
Agarose A 1,5	3,4	40,8	683,1	16,75	73,6	31,0
Hydroxylapatit	5,0	6,9	239,0	34,64	24,0	64,14
Sephadex G-200 (Fraktionen 54 - 59)	5,0	0,21	132,4	644,2	14,3	1.193,0

Tab. 7: Anreicherung der Coniferylalkohol-Dehydrogenase über verschiedene Methoden der Säulenchromatographie aus dem Rohextrakt von *R.erythropolis*.

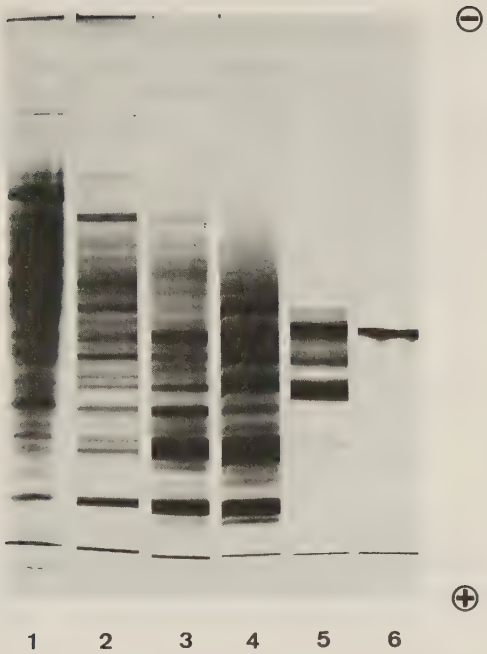


Abb. 17: Gelelektrophoretische Trennung des Rohextrakts (1) nach Anreicherung an DEAE-Cellulose (2), an Biogel A 1,5 (3), an Hydroxylapatit (4) und an Sephadex G-200 (5) sowie Aktivitätsfärbung der 1200fach angereicherten Fraktion (6).

4. Charakterisierung der angereicherten Coniferylalkohol-Dehydrogenase

a) Stabilitätstests

Während der Rohextrakt bei Kühlschranktemperatur über sechs Tage stabil blieb, zeigte das angereicherte Enzympräparat unter diesen Bedingungen eine schnelle Inaktivierung. Es wurden daher verschiedene Stabilisatoren getestet.
Die einzelnen Ansätze wurden bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt und täglich bezüglich der verbliebenen Restaktivität

gemessen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 8 dargestellt.

Nr.	Dithio-threitol (1 M) (µl)	2-Mer-capto-äthanol (1 M) (µl)	Poly-äthylen glycol (µl)	Enzym (U/ml)	Kalium-Phosphat-Puffer pH 7,5 (µl)	Aktivität nach 12 Tagen (%)
1	-	6	-	32	994	100
2	-	1	-	32	999	100
3	-	6	200	32	794	100
4	-	-	200	32	800	57,6
5	10	-	-	32	990	100
6	20	-	-	32	980	100
7	10	-	200	32	790	133[1)]
8	-	-	-	32	800	0[2)]

Tab. 8: Prozentuale Restaktivität der einzelnen Testansätze mit verschiedenen Stabilisatoren.

[1)] Die Anfangsaktivität war in dieser Kombination schon 33 % höher als bei den anderen Ansätzen.

[2)] Die Halbwertzeit betrug nur 2 Tage

Aus der Tabelle geht hervor, daß 2-Mercaptoäthanol und Dithiothreitol die Coniferylalkohol-Dehydrogenase stabilisieren. Für die folgenden Tests und zur Aufbewahrung wurde das Enzym mit Dimercaptoäthanol stabilisiert.

b) Temperaturstabilität

Das Enzym wurde in 100 mM Kalium-Phosphat-Puffer pH 7,5 bei verschiedenen Temperaturen im Wasserbad inkubiert und die Restaktivität nach 5 Minuten und 10 Minuten gemessen. Wie aus Abb. 18 ersichtlich ist, besitzt das Enzym eine ausgeprägte Temperaturempfindlichkeit.

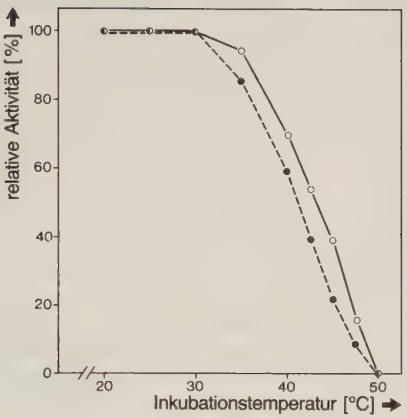


Abb. 18: Einfluß der Temperatur auf die Enzymaktivität nach 5 min (o——o) und 10 min (●---●) Inkubation.

c) pH-Stabilität

Getestet wurde die Stabilität des Enzyms in einem pH-Bereich zwischen 6,0 und 9,3 mit 100 mM Kalium-Phosphat-Puffer und 100 mM Tris-HCl-Puffer. Über einen Zeitraum von 14 Tagen wurden Proben entnommen und deren Restaktivität bestimmt.
In Tris-HCl-Puffer nahm die Stabilität des Enzyms mit steigendem pH-Wert schneller ab. Dagegen blieb die Enzymaktivität in Kalium-Phosphat-Puffer über den gesamten pH-Bereich von 6,0 - 8,0 konstant (Abb. 19).

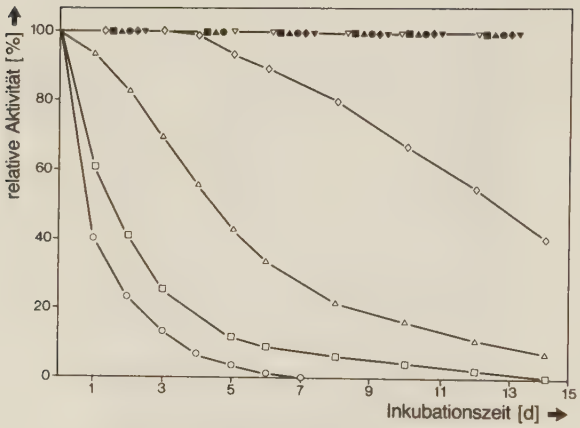


Abb. 19: Abnahme der Enzymaktivität während der Inkubation in Tris-HCl-Puffer bei pH 7,5 (▽——▽); pH 8,0 (◇——◇); 8,5 (△——△); 9,0 (□——□); 9,3 (○ ○) und in Kalium-Phosphat-Puffer bei pH 6,0; 6,5; 7,0; 7,5 und 8,0 (■▲●◆▼).

d) pH-Optimum

Zur Ermittlung des pH-Wirkungsoptimums wurde, anders als bei den sonstigen Tests, eine Entwertbestimmung nach 3 Minuten Reaktionszeit bei 24°C gemacht. Danach wurde der Ansatz auf pH 9,0 gebracht und die Extinktion bei der Wellenlänge 400 nm bestimmt.
Das Optimum der Kurve liegt im alkalischen Bereich bei pH 9,0 (Abb. 20) und ist somit vergleichbar mit dem der Zimtalkohol-Dehydrogenase aus Sojabohnen (Wyrambik und Grisebach, 1975).

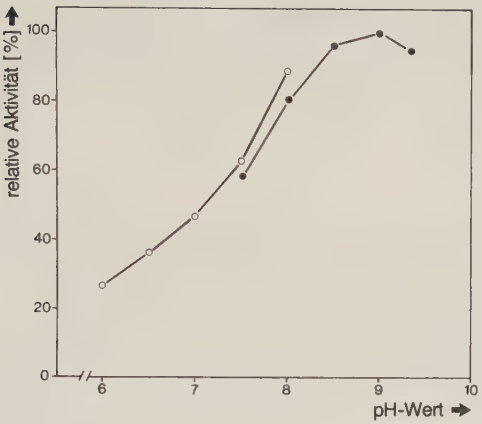


Abb. 20: pH-Optimumskurve der angereicherten Coniferylalkohol-Dehydrogenase.
Kalium-Phosphat-Puffer 0,1 M (o——o) Tris-HCl-Puffer 0,1 M (●——●)

e) Bestimmung des Molekulargewichts

Das apparente Molekulargewicht wurde mit einer kalibrierten Sephadex G-200 Säule bestimmt. Probe und Säule wurden, wie im Material- und Methodenteil beschrieben, vorbereitet und kalibriert.
Die Eichkurve ist in Abb. 21 dargestellt. Aus dem Elutionsvolumen wurde ein Molekulargewicht der Coniferylalkohol-Dehydrogenase von ungefähr 200 000 bestimmt.

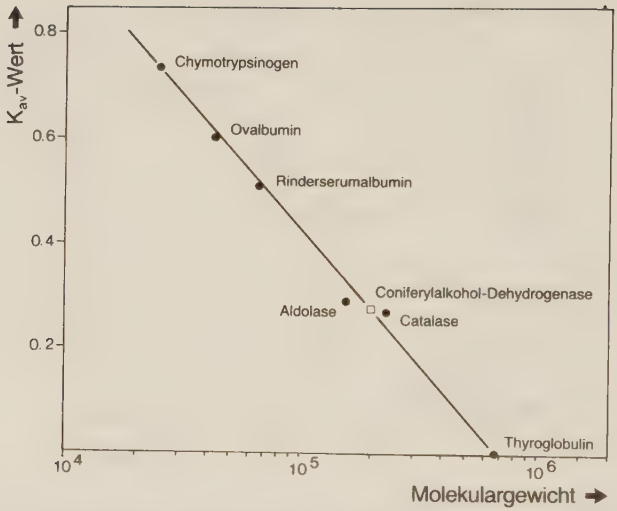


Abb. 21: Bestimmung des Molekulargewichts der Coniferylalkohol-Dehydrogenase aus der Eichkurve einer kalibrierten Sephadex G-200 Säule.

f) Einfluß von Inhibitoren auf die Enzymaktivität

Der Einfluß von verschiedenen Reagenzien auf die Oxidation des Coniferylalkohols durch das Enzym wurde untersucht. Dazu wurde der Inhibitor im Enzymansatz ohne NAD^+ 10 Minuten bei 24°C inkubiert. Mit dem Coenzym wurde die Reaktion gestartet.

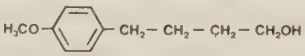
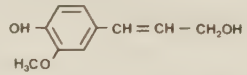
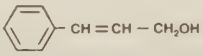
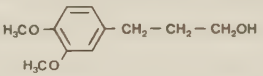
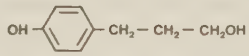
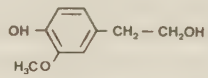
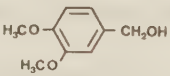
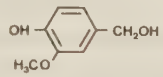
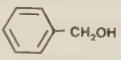
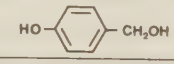
Durch das Sulfhydrylgruppen-Reagenz p-Chlormercuribenzoesäure, in einer Konzentration von 0,1 µM, wurde die Enzymaktivität vollständig gehemmt. Das weist darauf hin, daß ein Cystein-Rest entweder im aktiven Zentrum vorhanden ist oder die aktive Konformation des Enzyms aufrechterhält (Webb, 1963).
Auch die Sufhydryl-Reagenzien N-Äthylmaleimid und Jodoacetamid inhibieren die Coniferylalkohol-Dehydrogenase. Eine

Hemmung der Enzymaktivität um 50 % wurde mit Jodoacetamid durch eine Konzentration von 2,95 mM, mit N-Äthylmaleimid schon durch eine Konzentration von 0,11 mM bewirkt. Natriumazid und komplexierende Agenzien wie EDTA und α-α-Dipyridyl zeigten keinen meßbaren Einfluß auf die Coniferylalkohol-Oxidation.

g) Substratspezifität

Um die aus *R.erythropolis* isolierte Coniferylalkohol-Dehydrogenase mit anderen aromatischen Alkoholdehydrogenasen vergleichen zu können, wurde ihre Aktivität mit verschiedenen aromatischen und aliphatischen Alkoholen bestimmt. Die Ermittlung der relativen Aktivität des Enzyms gegenüber einer Reihe von Alkoholen erfolgte durch Messung der Anfangsreaktionsgeschwindigkeit.

Mit Äthanol konnte eine sehr geringe Aktivität (< 2 %) beobachtet werden. Alle anderen aliphatischen Alkohole wie Methanol, Isopropanol, Butanol, Amylalkohol, Hexanol und Octanol wurden von der Coniferylalkohol-Dehydrogenase jedoch nicht oxidiert.
Aus Tab. 9 ist ersichtlich, daß die Affinität des Enzyms zu Coniferylalkohol am größten war. Die primären aromatischen Alkohole Benzylalkohol, 4-Hydroxybenzylalkohol, Veratrylalkohol, Homovanillylalkohol, 3-(4-Hydroxyphenyl)-Propanol, sowie der sekundäre Alkohol 1-Phenyl-1-Propanol wurden nicht oxidiert. 3-(3,4-Dimethoxyphenyl)-Propanol und 4-(p-Methoxyphenyl)-1-Butanol wurden zu weniger als 2 % bezogen auf die Aktivität mit Coniferylalkohol umgesetzt.
Für Vanillylalkohol und Zimtalkohol wurde eine relative Aktivität von 14,4 % bzw. von 35,8 % gemessen.

Substrat	Strukturformel	relative Aktivität (%)	K_M-Wert (mM)
4-Methoxyphenyl-butanol		2,0	n. b.
Coniferylalkohol		100	0,387
Zimtalkohol		35,8	4,17
3-(3,4-Dimethoxy-phenyl)-Propanol		2,0	n. b.
3-(4-Hydroxyphe-nyl)-Propanol		-	-
1-Phenyl-1-Propa-nol		-	-
Homovanillylal-kohol		-	-
Veratrylalkohol		-	-
Vanillylalkohol		14,4	0,513
4-Hydroxybenzyl-alkohol		-	-
Benzylalkohol		-	-

Tab. 9: Vergleich der relativen Aktivität und des K_M-Werts der Coniferylalkohol-Dehydrogenase bei verschiedenen aromatischen Alkoholen.

Weiterhin wurden verschiedene Dimere und ein Coniferylalkohol-DHP-Präparat, das nach dünnschichtchromatographischer Analyse keinen freien Coniferylalkohol mehr enthielt, als Substrat eingesetzt. Überraschenderweise wurde mit den Dimeren Dehydrodiconiferylalkohol und Guaiacylglycerol-β-Coniferyläther und mit DHP eine positive Reaktion im Enzymansatz festgestellt.
Bei Dehydrodivanillylalkohol wurde jedoch keine Aktivität gemessen.

Alle Substrate mit einer α-β-ungesättigten Seitenkette wurden umgesetzt. Die vergleichbar geringe Aktivität mit Vanillylalkohol ist vermutlich auf eine ähnliche Substituentenanordnung am aromatischen Ring wie bei Coniferylalkohol zurückzuführen.

h) Bestimmung der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit und der K_M-Werte

Mit Hilfe eines Mikrocomputers wurden die Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten für verschiedene Konzentrationen von Coniferylalkohol bestimmt und durch nichtlineare Regression der Michaelis-Menten Beziehung angeglichen. Aus dieser Kurve konnten die reaktionskinetischen Parameter v_{max} und K_M berechnet werden.

Zum Vergleich wurden die K_M- und v_{max}-Werte auch auf konventionelle Weise bestimmt und aus dem Lineweaver-Burk Diagramm graphisch ermittelt (Tab. 10).

Die Abbildungen 22 a und b zeigen die Michaelis-Menten-Beziehung für Coniferylalkohol und NAD^+. Aus der $v_{max}/[S]$-Beziehung für Coniferylalkohol geht hervor, daß eine Substratinhibition, die durch einen K_I-Wert von 18,3 mM charakterisiert wird, auftritt.

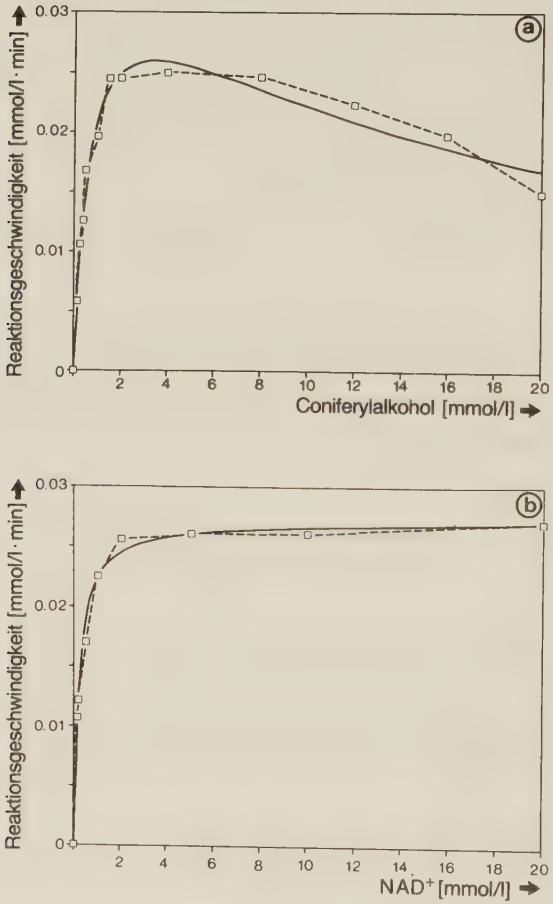


Abb. 22 a und b: Beziehung zwischen der Anfangsreaktionsgeschwindigkeit und der Coniferylalkohol- (Abb. 22 a) bzw. der NAD^+-Konzentration (Abb. 22 b). Die ausgezogene Linie zeigt den Verlauf der errechneten nichtlinearen Regression aus den gemessenen Werten (□---□).

Substrat	Michaelis-Menten-Beziehung			Lineweaver-Burk-Diagramm	
	v_{max} (mmol/l·min)	K_M-Wert (mM)	K_I-Wert (mM)	v_{max} (mmol/ l·min)	K_M-Wert (mM)
Coniferyl-alkohol	0,0357 ± 0,00208[1)]	0,645 ±0,091[1)]	18,3 ± 3,06[1)]	0,0278	0,387
Zimtalkohol	n. b.	n. b.	n. b.	0,0118	4,17
Vanillyl-alkohol	n. b.	n. b.	n. b.	0,48	0,513
NAD^+	0,0272 ±0,00069[1)]	0,220 ±0,0295[1)]	n. b.	0,030	0,19
$NADP^+$	n. b.	n. b.	n. b.	0,027	12.05

Tab. 10: Reaktionskinetische Parameter der Coniferylalkohol-Dehydrogenase für verschiedene Substrate, NAD^+ und $NADP^+$. (links rechnerische, rechts graphische Ermittlung).

1) Schwankungsbreite bei 68 % Vertrauensbereich

2) n. b. = nicht bestimmt

5. Abbauwege der Aromaten und Regulation der ringspaltenden Dioxygenasen

Nach dem heutigen Kenntnisstand werden alle Aromaten zu ortho- oder para-Diphenolen oxidiert, deren Benzenring extradiol oder intradiol gespalten wird (Dagley, 1978; Cain, 1980). Den ringspaltenden Enzymen kommt daher eine Schlüsselfunktion zu.
Vergleichende Untersuchungen zeigten, daß selbst innerhalb einer Gattung starke Variabilität bezüglich der Regulation besteht (Rann und Cain, 1973).

a) Abbauwege monomerer Aromaten

Für verschiedene monomere Aromaten wurde der Abbauweg mit Hilfe des Rothera-Tests bei *R.erythropolis* untersucht.
Dazu wurden Zellen, die auf den zu untersuchenden Aromagen gewachsen waren, in Tris-HCl-Puffer (50 mM, pH 80), mit Toluol (10 % v/v) und Protocatechusäure (4 mM) oder Catechol (2 mM) bei 28°C inkubiert. In Toluol behandelten Zellsuspensionen, kommt es infolge der Blockierung terminaler Reaktionen zu einer Anhäufung von Zwischenprodukten, die somit leicht erfaßbar werden (Kilby, 1948). Eine Gelbfärbung der Testansätze nach spätestens 60 Minuten zeigt die Bildung von Muconsäuresemialdehyd an, der bei einer extradiol-Spaltung von Protocatechusäure oder Catechol entsteht. Dies konnte in keinem Fall beobachtet werden.
Nach weiterer 20stündiger Inkubation der Ansätze, wurde der für β-Ketoadipinsäure spezifische Rothera-Test durchgeführt. Dieser ergab mit Ausnahme von Zellen, die auf Glucose, Acetat, Gentisinsäure und 3-Hydroxybenzoesäure gewachsen waren, eine positive Reaktion (Tab. 11).

Zur Bestätigung der gefundenen Ergebnisse wurde die Aktivität der β-Ketoadipat-Succinyl-CoA-Transferase im Rohextrakt der Zellen bestimmt. Erwartungsgemäß war dieses Enzym bei allen Kulturen, die einen positiven Rothera-Test ergaben, nachweisbar. Die extradiolspaltenden Enzyme Protocatechuat-2,3-Dioxygenase, Protocatechuat-4,5-Dioxygenase und Catechol-2,3-Dioxygenase konnten nicht nachgewiesen werden.

Wachstumssubstrate	Rothera Test	β-Ketoadipat-Succinyl-CoA-Transferase	Catechol-1,2-Dioxygenase (µmol/min·mg)	Protocatechuat-3,4-Dioxygenase (µmol/min·mg)
Coniferylalkohol	+	n. b.[1]	0,013	0,380
Coniferylaldehyd	+	n. b.	0,013	0,330
Ferulasäure	+	n. b.	0,017	0,340
Vanillinsäure	+	n. b.	0,024	0,310
4-Hydroxybenzoesäure	+	+	0,022	0,489
Protocatechusäure	+	+	0,019	0,331
Guaiacol[2]	+	+	0,310	0,280
Benzoesäure	+	+	0,349	0,505
Phenol	+	+	0,475	0,423
Catechol	+	+	0,410	0,300
3-Hydroxybenzoesäure	-	-	n. b.	n. b.
Gentisinsäure	-	-	n. b.	n. b.
Glucose	-	-	0,003	0,008
Acetat	-	-	0,004	0.008

Tab. 11: Ergebnisse des Rothera-Tests und der Enzymmessungen bei Zellen, die auf verschiedenen Substraten gewachsen waren.

[1] n. b. ≙ nicht bestimmt

[2] Die Werte wurden mit einer Guaicol$^{\oplus}$-Mutante gewonnen

Für die Substrate, Coniferylaldehyd, Ferulasäure, Vanillinsäure, 4-Hydroxybenzoesäure, Protocatechusäure, Guaiacol, Benzoesäure, Phenol und Catechol kann der β-Ketoadipat-Weg also als gesicherte Abbausequenz angesehen werden.

Um den Abbauweg in den Protocatechusäure-Zweig und den Catechol-Zweig unterscheiden zu können, wurden die spezifischen Oxygenasen im zellfreien Extrakt bestimmt. Daraus konnten auch nähere Angaben zur Vorbereitung des aromatischen Rings gewonnen werden.
Im Rohextrakt von Glucose- und Acetat-Zellen wurde nur eine geringe Grundaktivität der Protocatechuat-3,4-Dioxygenase und der Catechol-1,2-Dioxygenase gefunden.
Beim Wachstum auf den Substraten Coniferylalkohol, Coniferylaldehyd, Ferulasäure, Vanillinsäure, 4-Hydroxybenzoesäure und Protocatechusäure wurde eine hohe Aktivität der Protocatechuat-3,4-Dioxygenase gemessen, so daß angenommen werden kann, daß diese Substanzen über den Protocatechusäure-Zweig metabolisiert werden.
Im Rohextrakt von Zellen, die auf Benzoesäure, Guaiacol, Phenol oder Catechol gewachsen waren, war für beide Dioxygenasen eine hohe spezifische Aktivität nachweisbar (Tab.11).
Cain (1979) berichtete, daß ein der Gattung *Rhodococcus* eng verwandter *Nocardia* Stamm Benzoesäure sowohl über Protocatechusäure als auch über Catechol abbauen kann. Bei dieser Annahme wäre im Fall von *R.erythropolis* zumindest für Benzoesäure die gleichzeitige Nutzung beider Wege vorstellbar.
Es wurden deswegen Mutanten, ohne Protocatechuat-3,4-Dioxygenase Aktivität isoliert, um zu prüfen, ob diesem Enzym eine physiologische Bedeutung beim Wachstum auf Benzoesäure, Phenol, Guaiacol und Catechol zukommt.
Die Protocatechusäure$^{\ominus}$-Mutanten konnten erwartungsgemäß Protocatechusäure nicht mehr oxidieren, wuchsen aber auf Benzoesäure oder Phenol normal (Tab.12), ohne Protocatechuat-3,4-Dioxygenase zu bilden. Das spricht dafür, daß der Wildtyp die Protocatechuat-3,4-Dioxygenase beim Wachstum auf Benzoesäure,

Phenol, Guaiacol und Catechol nicht benötigt.
Eine Catechol$^{\ominus}$-Mutante konnte auf diesen Substraten nicht wachsen, bildete aber auf Protocatechusäure eine hohe Protocatechuat-3,4-Dioxygenase Aktivität. Daraus kann man ableiten, daß diese Substrate über den Catechol-Zweig abgebaut werden.

Stammbezeichnung	Wachstumssubstrat	Wachstum	Catechol-1,2-Dioxygenase (µmol/min·mg)	Protocatechuat-3,4-Dioxygenase (µmol/min·mg)
Protocatechusäure$^{\ominus}$ (Stamm 1)	Benzoesäure	+	0,63	-
	Protocatechusäure	-	-	-
Protocatechusäure$^{\ominus}$ (Stamm 2)	Benzoesäure	+	0,86	-
	Protocatechusäure	-	-	-
Wildtyp	Benzoesäure	+	0,35	0,50
	Protocatechusäure	+	0,019	0,51

Tab. 12: Enzymaktivitäten der beiden ringspaltenden Dioxygenasen beim Wachstum der Protocatechusäure$^{\ominus}$-Mutanten und des Wildtyps auf Precursorn des Protocatechusäure- und des Catechol-Zweigs.

Die Kenntnis des Abbauwegs einer Substanz läßt auch Rückschlüsse auf vorangeschaltete Reaktionen wie Demethoxylierung, Hydroxylierung und Oxidation der Seitenkette zu. Demethoxylierung und Hydroxylierung werden meist durch spezifische Enzyme katalysiert (Smith und Davis, 1980). Dies zeigten Bernhardt et al. (1970) bei *Pseudomonas putida* und Eggeling und Sahm (1980) bei *R.erythropolis* für die Demethoxylierung.
Ein spezifischer Nachweis der Hydroxylasen gelang trotz verschiedener Versuche nur für die 4-Hydroxybenzoat-3-Monoxygenase.
Einen Hinweis auf die Spezifität der jeweiligen Monooxygenasen gaben Messungen des Sauerstoffverbrauchs mit ganzen Zellen.
Wie die folgende Tabelle zeigt, konnten die Zellen nur diejenigen Substrate oxidieren, auf denen sie kultiviert worden waren.

Wachstums-substrat	Oxidationssubstrat					
	4-Hydroxy-benzoesre.	Protoca-techusre.	Phenol	Benzoe-säure	3-Hydroxy-benzoesre.	Ferula-säure
4-Hydroxy-benzoesre.	+	+	-	-	-	-
Protoca-techusre.	-	+	-	-	-	-
Phenol	-	+	+	-	-	-
Benzoesre.	-	+	-	+	-	-
3-Hydroxy-benzoesre.	-	-	-	-	+	-
Ferulasre.	-	+	-	-	-	+

Tab. 13: Messungen des Sauerstoffverbrauchs ganzer Zellen mit verschiedenen Aromaten.

b) Regulation der Protocatechuat-3,4-Dioxygenase und der Catechol-1,2-Dioxygenase

Die gefundenen Werte der spezifischen Aktivität für die Protocatechuat-3,4-Dioxygenase und für die Catechol-1,2-Dioxygenase weisen darauf hin, daß auch in *R.erythropolis* regulatorische Beziehungen zwischen dem Protocatechusäure-Zweig und dem Catechol-Zweig des β-Ketoadipat-Wegs bestehen.
Aus Tab.11 ist ersichtlich, daß beim Wachstum auf allen Substraten, die über den β-Ketoadipat-Weg metabolisiert wurden, eine nahezu gleich hohe spezifische Aktivität der Protocatechuat-3,4-Dioxygenase zu beobachten war. Demgegenüber wurde die Catechol-1,2-Dioxygenase nur durch Substrate, die über den Catechol-Zweig abgebaut werden, induziert.
Das bedeutet, daß der Induktor der Protocatechuat-3,4-Dioxygenase entweder das Substrat selbst und eine sehr ähnlich aufgebaute aromatische Substanz, oder aber ein Metabolit der beiden konvergierenden Zweige ist.
Aromatische Substanzen, die über den Protocatechusäure-Zweig

abgebaut wurden, bewirkten noch eine 4 bis 5fach höhere Aktivität für die Catechol-1,2-Dioxygenase als der Grundaktivität beim Wachstum auf Glucose oder Acetat entsprach. Dies läßt auf eine Quervernetzung der beiden Zweige des β-Ketoadipat-Wegs bezüglich der Regulationsmechanismen schließen.
Um Einblick in die Regulation des β-Ketoadipat-Wegs bei *R.erythropolis* zu bekommen, wurden verschiedene Mutanten isoliert, die an verschiedenen Stellen im β-Ketoadipat-Weg geblockt waren.
Mit den bereits beschriebenen Protocatechusäure$^{\ominus}$-Mutanten konnte gezeigt werden, daß die Protocatechuat-3,4-Dioxygenase bei der Verwertung von Catechol ohne erkennbaren Vorteil induziert wird. Die Antwort, ob dieses Enzym durch Catechol selbst, als Substratanalogon, oder durch einen aus Catechol entstandenen Metaboliten induziert wird, konnte eine Catechol$^{\ominus}$-Mutante geben. In Übertragungsversuchen von Glucose gewachsenen Zellen der Catechol$^{\ominus}$-Mutante auf Benzoesäure oder Phenol wurden die Substrate zu Catechol oxidiert und im Medium angereichert. (Abb. 23). Die Mutante wuchs dagegen auf Protocatechusäure normal und besaß eine dem Wildtyp entsprechende Protocatechuat-3,4-Dioxygenase-Aktivität.

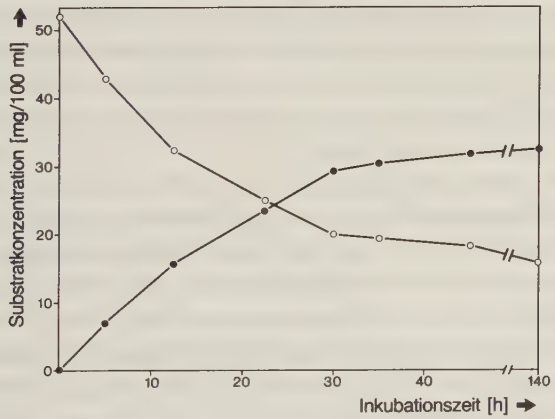


Abb. 23: Umsatzrate von Benzoesäure (o——o) zu Catechol (●——●) in einer Übertragungskultur der Catechol$^{\ominus}$-Mutante.

Aus den Zellen der Übertragungskultur wurden nach verschiedenen Zeiten Rohextrakte hergestellt und die Aktivität der Protocatechuat-3,4-Dioxygenase und der Catechol-1,2-Dioxygenase bestimmt. Es konnte aber keines der beiden Enzyme nachgewiesen werden, so daß Catechol als Induktor der Protocatechuat-3,4-Dioxygenase auszuschließen ist.
In einem Kontrollversuch wurden Zellen des Wildtyps, die auf Glucose gewachsen waren, in Kalium-Phosphat-Puffer mit Protocatechusäure (0,5 g/l) oder Benzoesäure (0,5 g/l) übertragen. In beiden Fällen wurden die Dioxygenasen induziert. Die Zellen müssen daher nach der Kultur auf Glucose genügend Nährstoffe enthalten, um die notwendigen Enzyme synthetisieren zu können.
Wurde die Catechol$^{\ominus}$-Mutante mit Benzoesäure oder Phenol plus Glucose als Wachstumssubstrat kultiviert, reicherte sich zwar Catechol zunächst an, wurde jedoch allmählich über cis-cis-Muconsäure weiter oxidiert. Im Rohextrakt dieser Zellen wurde eine normale Aktivität für die Protocatechuat-3,4-Dioxygenase (0,43 µmol/min · mg) gemessen.
Bei der Mutante handelt es sich offenbar um eine leaky-Form, die in Anwesenheit einer leicht metabolisierbaren Kohlenstoff- und Energiequelle auch eine geringe Aktivität der Catechol-1,2-Dioxygenase aufweist (0,044 µmol/min · mg).
Eine direkte Überprüfung, ob β-Ketoadipinsäure bei der Regulation der Protocatechuat-3,4-Dioxygenase in *R. erythropolis* beteiligt ist, war nicht möglich, da der Wildtyp auf diesem Substrat nicht wuchs.
Rann und Cain (1969) beschrieben aber, daß eine für cis-cis-Muconsäure permeable Mutante von *Nocardia opaca* auch auf β-Ketoadipinsäure exponentiell wachsen kann und in diesem Fall alle Enzyme des Protocatechsäure-Zweigs induziert wurden. Die gleichen Induktionseigenschaften hatte bei der Mutante auch die strukturanaloge Adipinsäure. Sie bewirkte allerdings, verglichen mit 4-Hydroxybenzoesäure gewachsenen Zellen, nur eine ca. 10 %ige Induktion der Enzyme. Bei

Jensenia canicruria fanden dieselben Autoren, daß die beiden Substanzen, Adipinsäure und β-Ketoadipinsäure nur die Protocatechuat-3,4-Dioxygenase und nicht die gesamte Enzymsequenz induzierten (Rann und Cain, 1973).
Im Gegensatz zu diesen Beobachtungen konnte *R.erythropolis* zwar auf Adipinsäure wachsen, es wurde jedoch keine signifikante Aktivitätssteigerung der ringspaltenden Dioxygenasen ($< 0{,}002$ µmol/min · mg) gegenüber der Grundaktivität bewirkt. Strukturanaloge Substrate wie Pimelinsäure, Suberinsäure und Muconsäure wurden nicht als Substrat verwertet. Daher wurde, wie in Material und Methoden beschrieben, eine β-Ketoadipinsäure verwertende Mutante isoliert. Beim Wachstum dieses Stamms auf β-Ketoadipinsäure war eine relativ hohe Aktivität der Protocatechuat-3,4-Dioxygenase (0,174 µmol/min · mg) festzustellen. Die Aktivität der Catechol-1,2-Dioxygenase entsprach der Grundaktivität.
Dies läßt den Schluß zu, daß β-Ketoadipinsäure an der Regulation der Protocatechuat-3,4-Dioxygenase beteiligt ist (Abb. 26).

Die Catechol-1,2-Dioxygenase wird bei mehreren Organismen der Gattungen *Pseudomonas* (Ornston, 1966), *Acinetobacter* (Cánovas und Stanier, 1967) und *Nocardia* (Cain, 1980) durch cis-cis-Muconsäure induziert. Dagegen ist der Induktur bei *Alcaligenes eutrophus* (Johnson und Stanier, 1971) und bei den meisten Pilzen (Cain et al., 1968) Catechol oder Benzoesäure.
Ob bei *R.erythropolis* das Substrat oder ein Metabolit des β-Ketoadipat-Wegs an der Regulation der Catechol-1,2-Dioxygenase beteiligt ist, wurde mit Hilfe einer Mutante, die cis-cis-Muconsäure nicht mehr oxidieren kann, untersucht. Wird dieser Stamm von einer Kultur in Komplettmedium auf Minimalmedium mit 0,5 g/l Catechol übertragen, wurde Catechol langsam zu cis-cis-Muconsäure oxidiert (Abb. 24).

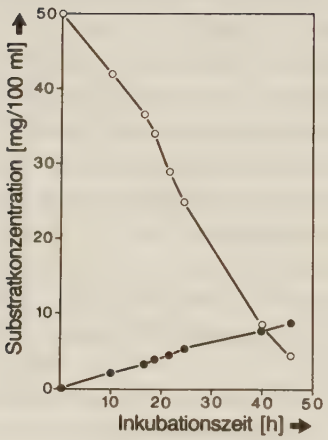


Abb. 24: Umsatzrate von Catechol (o——o) zu cis-cis-Muconsäure (●——●) in einer Übertragungskultur der cis-cis-Muconsäure$^{\ominus}$-Mutante auf Catechol.

Von Zellen, die verschieden lange mit Catechol inkubiert worden waren, wurden Rohextrakte hergestellt und die spezifische Aktivität der Catechol-1,2-Dioxygenase bestimmt. Sie entsprach etwa der des Wildtyps beim Wachstum auf Benzoesäure. Die Protocatechuat-3,4-Dioxygenase war nicht nachweisbar.

Es ist daher unwahrscheinlich, daß bei *R.erythropolis* ein Metabolit nach cis-cis-Muconsäure für die Induktion der Catechol-1,2-Dioxygenase verantwortlich ist.

Eine nähere Aussage darüber, ob cis-cis-Muconsäure oder Catechol selbst der Induktor der Catechol-1,2-Dioxygenase ist, war mit der beschriebenen Mutante nicht möglich zu unterscheiden.

Versuche, die mit einer für β-Carboxy-cis-cis-Muconsäure-Cycloisomerase defekten Mutante gemacht wurden, sprechen aber für eine Produktinduktion.

Die β-Carboxy-cis-cis-Muconsäure$^{\ominus}$-Mutante wurde von Komplettmedium auf Minimalmedium mit 0,5 g/l Protocatechusäure übertragen. Es zeigte sich, wie in Abb. 25 dargestellt ist, daß die Protocatechusäure langsam zu β-Carboxy-cis-cis-Muconsäure oxidiert wurde. Der im Kulturfiltrat angereicherte Anteil konnte mit Hilfe der Hochdruckflüssigkeitschromatographie bestimmt werden. Der gleiche Effekt wurde auch bei Wachstumsversuchen auf Glucose (0,5 g/l) plus Protocatechusäure (0,5 g/l) beobachtet.
Erst nach 4 Tagen war die Protocatechusäure quantitativ zu β-Carboxy-cis-cis-Muconsäure oxidiert.

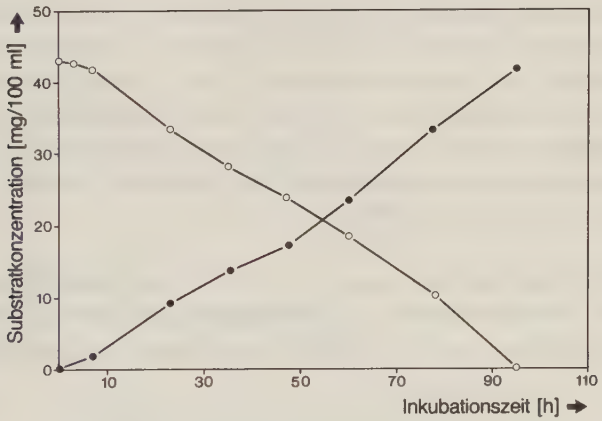


Abb. 25: Abnahme der Protocatechusäure (o—o) und Zunahme der β-Carboxy-cis-cis-Muconsäure (●—●) in einer Übertragungskultur der β-Carboxy-cis-cis-Muconsäure$^{\ominus}$-Mutante von Komplettmedium auf Protocatechusäure.

Zur Bestimmung der Enzymaktivität wurden Zellen der stationären Phase aus dem Wachstumsversuch aufgeschlossen. Die

Protocatechuat-3,4-Dioxygenase erreichte eine spezifische Aktivität von 0,100µmol/min · mg. Auffallend war, daß in dieser Kultur auch die Catechol-1,2-Dioxygenase induziert wurde. Ihre spezifische Aktivität betrug sogar 0,303 µmol/min · mg, was den Werten, die beim Wildtyp auf Benzoesäure oder Phenol gefunden wurden, entsprach.

Da Protocatechusäure selbst die Catechol-1,2-Dioxygenase nicht induziert, wie die Versuche mit den Protocatechusäure$^{\ominus}$-Mutanten zeigten, könnte die Bildung dieses Enzyms in Anwesenheit von β-Carboxy-cis-cis-Muconsäure bedeuten, daß β-Carboxy-cis-cis-Muconsäure als Strukturanalogon der cis-cis-Muconsäure die Catechol-1,2-Dioxygenase auch induzieren kann. Das macht wahrscheinlich, daß der natürliche Induktor der Catechol-1,2-Dioxygenase in *R.erythropolis* ihr Produkt die cis-cis-Muconsäure ist. Dieses Ergebnis gibt auch eine Erklärung für die höhere Catechol-1,2-Dioxygenase Aktivität im Wildtyp beim Wachstum auf Precursorn des Protocatechusäure-Zweigs gegenüber Glucose oder Acetat gewachsenen Zellen.

In der folgenden Abbildung sind die Induktionsmechanismen der Protocatechuat-3,4-Dioxygenase und der Catechol-1,2-Dioxygenase in *R.erythropolis* schematisch dargestellt.

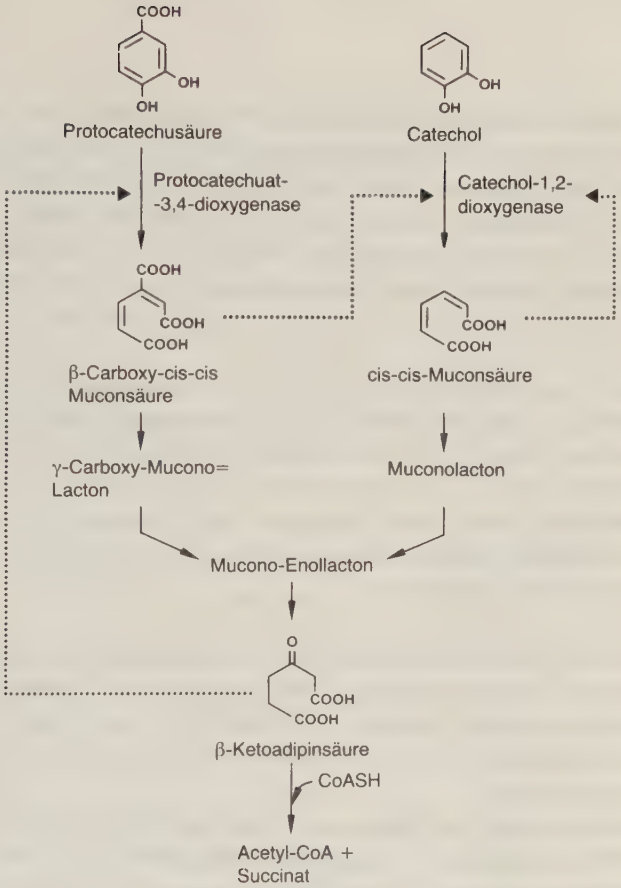


Abb. 26: Schema der Induktionsmechanismen der Protocatechuat-3,4-Dioxygenase und der Catechol-1,2-Dioxygenase bei *R.erythropolis*.

6. Versuche mit Mischsubstraten in kontinuierlicher Kultur

In der Natur steht den Bodenbakterien meist eine Vielzahl verschiedener Kohlenstoffquellen gleichzeitig als Substrat zur Verfügung. Die Menge jedes einzelnen Substrats ist aber meist begrenzt.

Mehrere Substrate können entweder gleichzeitig oder nacheinander mit mehr oder weniger stark ausgeprägter Diauxie abgebaut werden. So beschrieben Karanth und Reber (1979), daß *Pseudomonas testosteroni* 4-Hydroxybenzoesäure gegenüber 4-Hydroxyzimtsäure in einer Mischsubstratkultur bevorzugt verwertet. 4-Hydroxybenzoesäure inhibiert als Intermediärprodukt der 4-Hydroxyzimtsäure deren Abbau.

Die Untersuchung derartiger Regulationsmechanismen kann in einer kontinuierlichen Kultur (Chemostat) durchgeführt werden. Diese Technik erlaubt, Zellen, die mit submaximaler Rate bei konstanter Substratkonzentration und unter Kohlenstofflimitation wachsen, im Fließgleichgewicht zu untersuchen. Somit können natürliche Gegebenheiten teilweise simuliert werden.

In den folgenden Experimenten wurde sowohl ein Gemisch zweier Aromaten als auch ein Gemisch aus Glucose und einem Aromaten benutzt, um deren Verwertung und Einfluß auf die Aktivität der ringspaltenden Dioxygenasen zu untersuchen.
Glucose wurde gewählt, da unter natürlichen Bedingungen oder in definierten Mischkulturen beim Abbau von Pflanzenmaterial auch Kohlenhydrate zu erwarten sind.

a) Bestimmung der Wachstumsparameter

Im Chemostat wurden Experimente mit den folgenden Substratgemischen und den entsprechenden Kontrollen durchgeführt.
a) 4-Hydroxybenzoesäure + Ferulasäure
b) 4-Hydroxybenzoesäure
c) Ferulasäure
d) Ferulasäure + Glucose
e) Glucose
Die erreichte Zellmasse sowie die aktuellen Substratkonzentrationen wurden in Abhängigkeit von der jeweiligen Verdünnungsrate bestimmt und sind in der Abb. 27 dar-

gestellt. Für alle Kohlenstoffquellen wurde unter steady state Bedingungen bei niedrigen Verdünnungsraten ein vergleichbarer Zellertrag von $Y \frac{max}{\bar{x}/\bar{s}} = 0,4 - 0,5$ erreicht. Aus Abb. 27 ist ersichtlich, daß 4-Hydroxybenzoesäure und Ferulasäure bis zur kritischen Verdünnungsrate von ca. 0,26 h^{-1} durch *R.erythropolis* simultan verwertet werden. Es liegt also keine Katabolitrepression vor, wie für verschiedene *Pseudomonaden* beim Wachstum auf 4-Hydroxybenzoesäure und 4-Hydroxyzimtsäure (Karanth und Reber, 1979) oder 4-Hydroxybenzoesäure und Benzoesäure (Higgins und Mandelstam , 1972) beschrieben wurde.

In der Mischsubstratkultur mit Ferulasäure und Glucose lag die Ferulasäurekonzentration bei der Verdünnungsrate 0,2 h^{-1} vergleichbar hoch, wie beim Wachstum auf dem Aromatengemisch oder auf Ferulasäure alleine. In Kombination mit Glucose wurde Ferualsäure aber auch noch bei höheren Verdünnungsraten als im Aromatengemisch und in der Einzelsubstratkultur verwertet. Ebenso konnte auch die Glucose in der Mischsubstratkultur noch bei höheren Verdünnungsraten genutzt werden, als dies mit Glucose alleine möglich war. Ein Gemisch von Glucose und Ferulasäure begünstigt also die Verwertung beider Substrate gegenüber der Einzelsubstratkultur (Abb. 27). Entsprechend war auch die kritische Verdünnungsrate (D_c), bei der die Zellen ausgewaschen werden, zu höheren Werten verschoben. Die Werte der kritischen Verdünnungsrate können näherungsweise aus dem $\bar{x}/D$-Diagramm abgelesen werden. Dieser Wert entspricht ungefähr der maximalen Wachstumsrate (Pirt, 1975).

Die maximalen Wachstumsraten, die *R.erythropolis* in den verschiedenen kontinuierlichen Kulturen erreicht, sind in Tab. 14 aufgeführt.

Wachstums-parameter		Chemostat-Kultur auf verschiedenen Kohlenstoffquellen				
		4-Hydroxy-benzoesre + Ferula-säure	4-Hydroxy-benzoesre.	Ferula-säure	Ferulasre. + Glucose	Glucose
$Y \frac{max}{x/s}$		0,5	0,4	0,49	0,51	0,46
$\mu_{max}(h^{-1})$		0,264	0,240	0,234	0,295	0,222
q_{max}(mg/l·h)	4OHB	85	168	179	Fsre 85	168
	Fsre	85			Gluc 112	

Tab. 14: Zellausbeute, maximale Wachtumsrate und maximale Substratumsatzrate für *R.erythropolis* in kontinuierlicher Kultur auf verschiedenen Kohlenstoffquellen.
Bei den Mischsubstratkulturen sind die Substratumsatzraten für beide Kohlenstoffquellen getrennt aufgeführt (4-Hydroxybenzoesäure ≙ 4OHB, Ferulasäure ≙ Fsre, Glucose ≙ Gluc).

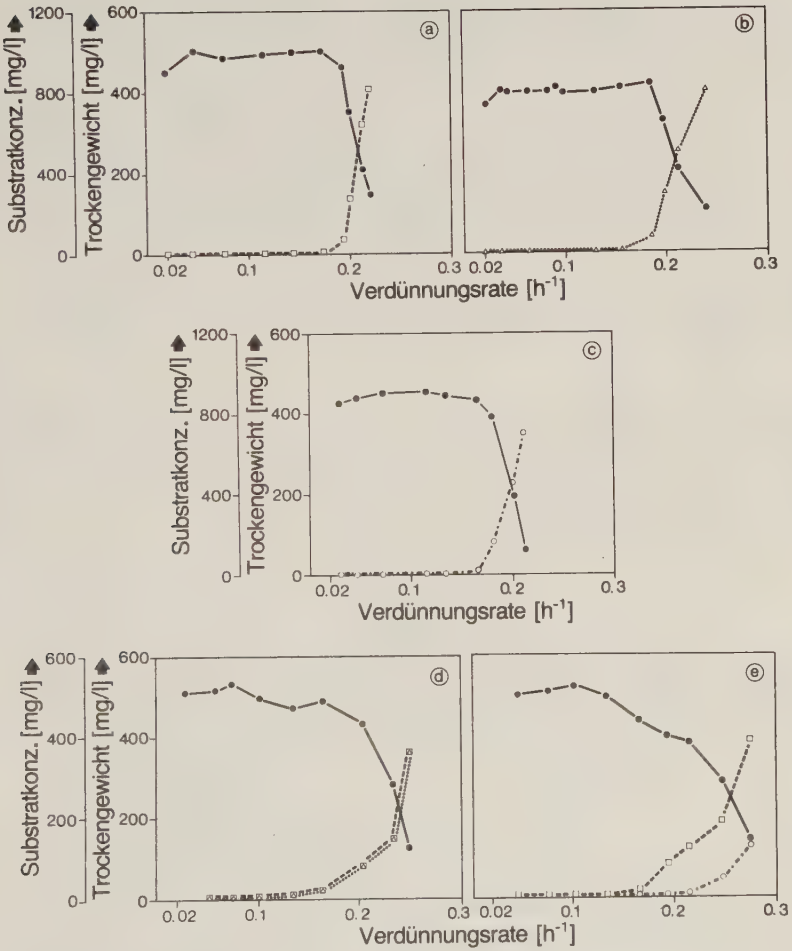


Abb. 27 a bis e: Abhängigkeit des Trockengewichts (●——●) und der Substratkonzentration (offene Symbole) von von der jeweiligen Verdünnungsrate in kontinuierlicher Kultur mit verschiedenen Kohlenstoffquellen. a) Ferulasäure (□- - -□); b) 4-Hydroxybenzoesäure (△·····△); c) Glucose (○·····○); d) 4-Hydroxybenzoesäure(△·····△) + Ferualsäure (□- - -□); e) Ferulasäure (□- - -□) + Glucose (○·-·-○).

Aus Abb. 27 e (Mischsubstratkultur mit Ferulasäure und Glucose) geht weiterhin hervor, daß der Organismus bei höheren Wachstumsraten mehr Glucose verwertet als Ferulasäure.
Die Umsatzrate für Ferulasäure erreichte bei einer Verdünnungsrate von 0,21 h^{-1} ein Maximum von 85 mg/l·h, während der höchste Glucoseverbrauch von 112 mg/l·h bei einer Verdünnungsrate von 0,25 h^{-1} lag (Tab. 14). Bei dieser Verdünnungsrate wurde Glucose um den Faktor 1,45 mehr oxidiert als Ferulasäure.
Beim Wachstum auf dem 4-Hydroxybenzoesäure-Ferulasäure Gemisch wurden beide Substrate parallel verwertet. Die jeweiligen Substratumsatzraten erreichten deshalb ein Maximum bei derselben Wachstumsrate.

Bezieht man die Substratumsatzrate auf die Zelldichte (mg/l), resultiert daraus die spezifische Umsatzrate (Q_s (mg/mg·h)). Diese stellt unter den Bedingungen des Wachstums auf Mischsubstraten eine zusammengesetzte Größe dar.

$$Q_{s(tot)} = \frac{\mu}{Y} = \frac{D \cdot (\Delta S_1 \cdot \Delta S_2)}{\bar{x}_{tot}}$$

Für jedes Substrat kann eine getrennte spezifische Umsatzrate berechnet werden.

$$Q_{s1} = \frac{D \cdot \Delta S_1}{\bar{x}_{tot}} \qquad Q_{s2} = \frac{D \cdot \Delta S_2}{\bar{x}_{tot}}$$

Diese sind in Abb. 28 a und b für jedes Substrat in Abhängigkeit zur Verdünnungsrate dargestellt.
Die spezifischen Substratumsatzraten für Ferulasäure und 4-Hydroxybenzoesäure im Gemisch und bei alleiniger Verwertung zeigen einen nahezu linearen Anstieg (Abb. 28 a). Dies bedeutet, daß der Ertrag bei diesen Kulturen unabhängig von der Wachstumsrate konstant bleibt.
Dagegen nimmt die spezifische Umsatzrate für Glucose bei höheren Verdünnungsraten exponentiell zu (Abb. 28 b). *R.erythropolis* verwertet also noch Glucose, ohne daß daraus proportional

Biomasse gebildet wird. In der Mischsubstratkultur mit Ferulasäure und Glucose zeigt die spezifische Umsatzrate für Glucose einen ähnlichen Verlauf, während die spezifische Umsatzrate für Ferulasäure bei einer Verdünnungsrate von 0,27 h^{-1} ein Maximum hat (Abb. 28 b).
Die hohe spezifische Umsatzrate für Glucose könnte in der Mischsubstratkultur die Voraussetzung dafür sein, daß Ferulasäure auch noch bei höheren Verdünnungsraten genutzt werden kann als in der Einzelsubstratkultur.

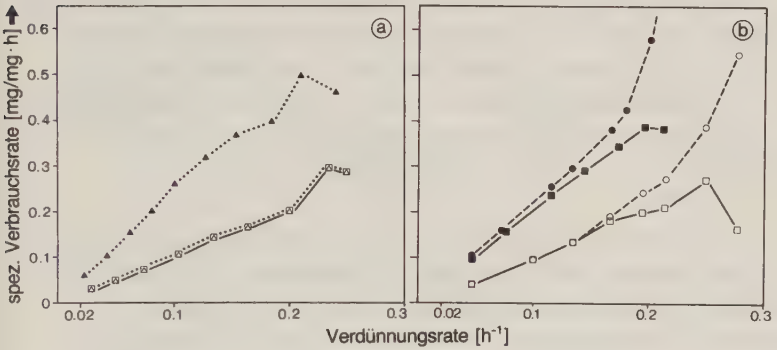


Abb. 28 a und b: Spezifische Umsatzrate der einzelnen Substrate in Abhängigkeit von der Wachstumsrate (≙ Verdünnungsrate) bei den Einzel- und Mischsubstratkulturen.
a) 4-Hydroxybenzoesäure (Δ·····Δ) + Ferulasäure (□——□)] Abb. 28 a
b) 4-Hydroxybenzoesäure (▲·····▲)
c) Ferulasäure (□——□) + Glucose (○- - -○)] Abb. 28 b
d) Ferulasäure (■——■)
e) Glucose (●- - -●)

b) Einfluß der Wachstumsrate auf die Enzymaktivität der ringspaltenden Dioxygenasen

Eine regulatorische Beeinflussung bei der Verwertung von Mischsubstraten könnte sich in veränderter Enzymaktivität wiederspiegeln. Es wurde deswegen der Einfluß der Wachstumsrate

auf die Aktivität der Protocatechuat-3,4-Dioxygenase und der Catechol-1,2-Dioxygenase, als Schlüsselenzyme des β-Ketoadipat-Wegs, untersucht.

In den Einzelsubstratkulturen mit 4-Hydroxybenzoesäure und Ferulasäure - die beide über den Protocatechusäure-Zweig abgebaut werden - war, entsprechend den Batch-Kulturen, bei allen Verdünnungsraten nur eine geringfügige Catechol-1,2-Dioxygenase Aktivität nachweisbar. Die spezifische Aktivität der Protocatechuat-3,4-Dioxygenase stieg aber mit zunehmender Verdünnungsrate auf 0,6 µmol/min · mg an. Der Verlauf der Aktivitätskurve für die Protocatechuat-3,4-Dioxygenase zeigt also eine deutliche Abhängigkeit von der jeweiligen Verdünnungsrate. Ähnliche Enzymaktivitäten wurden auch in Zellen, die auf dem Aromatengemisch gewachsen waren, festgestellt (Abb. 29 a).

Ein anderer Verlauf der Enzymaktivitäten wurde beim Wachstum auf einem Ferulasäure-Glucose Gemisch beobachtet (Abb. 29 b). Die spezifische Aktivität der Catechol-1,2-Dioxygenase war bei niedriger Verdünnungsrate auffallend hoch und betrug bis zu einer Verdünnungsrate von 0,08 h^{-1} ca. 50 % der spezifischen Aktivität wie sie in Batch-Kulturen auf Benzoesäure und Phenol gemessen wurde. Mit steigender Verdünnungsrate nahm die Aktivität jedoch rapide ab und blieb im weiteren Verlauf auf einem konstanten Niveau, das dem der anderen Kulturen entsprach (Abb. 29 b).
Da die Catechol-1,2-Dioxygenase beim Wachstum auf Ferulasäure normalerweise nicht induziert wird, spricht ihre hohe Aktivität bei niedrigen Verdünnungsraten für eine regulatorische Beeinflussung, die durch die simultane Verwertung von Glucose bedingt ist.

Die spezifische Aktivität der Protocatechuat-3,4-Dioxygenase stieg wie bei den anderen kontinuierlichen Kulturen mit steigender Verdünnungsrate an und erreichte eine spezifische Aktivität von 0,32 µmol/min · mg (Abb. 29 b).

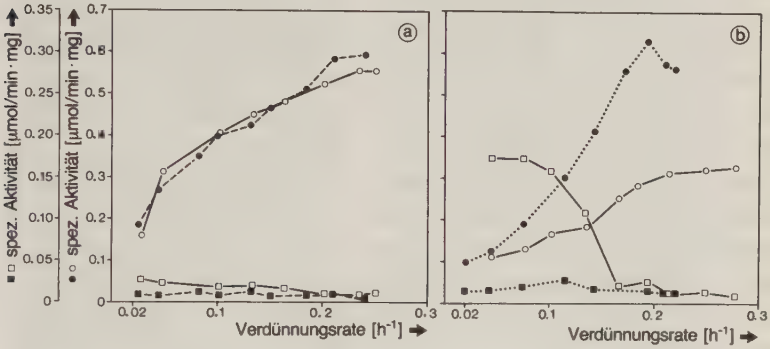


Abb. 29 a und b: Spezifische Aktivität der Protocatechuat-3,4-Dioxygenase (runde Symbole) und der Catechol-1,2-Dioxygenase (eckige Symbole) in Abhängigkeit von der Wachstumsrate bei den Einzel- und Mischsubstratkulturen.
a) 4-Hydroxybenzoesäure + Ferulasäure (———)] Abb. 29 a
b) 4-Hydroxybenzoesäure (- - - - -)
c) Ferulasäure (·····)] Abb. 29 b
d) Ferulasäure + Glucose (———)

c) Einfluß der Wachstumsrate auf die Zellmorphologie

Die Wachstumsrate beeinflußt nicht nur die Physiologie sondern auch die Morphologie der Zellen.
Schnell wachsende Zellen haben eine größere durchschnittliche Zellmasse als langsam wachsende Zellen. Dies zeigten Herbert (1961) an *Bacillus megaterium*, Schaechter et al. (1958) an *Salmonella typhimurium* und Huber et al. (1975) an *Rhodotorula mucilaginosa*.
Mit der Änderung des Oberflächen-Volumen Verhältnis variiert häufig auch das äußere Erscheinungsbild. Diese Erkenntnis gewannen Luscombe und Gray (1971) sowie Matin und Veldkamp (1978) an Spezies der Gattungen *Arthrobacter* und *Spirillium*.

Durch mikroskopische Untersuchungen der Fermenterkulturen wurde auch bei *R.erythropolis* eine Änderung der Größe und der Form unter bestimmten Wachstumsbedingungen beobachtet.

Die folgenden vier Abbildungen von steady state Zellen zeigen deutlich die Abhängigkeit der Zellform von der jeweiligen Verdünnungsrate. Bei niedriger Rate waren die Zellen fast coccoid und wurden mit zunehmender Verdünnungsrate länger. Erst bei fast maximaler Rate war die für *Nocardia* und *Rhodococcus* als typisch beschriebene Form ausgebildet (Stanier et al., 1970).
Dieses Phänomen wurde unabhängig von der Art der Kohlenstoffquelle bei allen kontinuierlichen Kulturen beobachtet. Nach Veldkamp (1976) und Kuenen et al. (1977) begünstigt ein großes Oberflächen-Volumen Verhältnis die Aufnahme der Nährstoffe bei geringer Substratkonzentration. Dies ist möglicherweise auch bei *R.erythropolis* eine Erklärung für die unterschiedlich ausgeprägten Zellformen bei verschiedenen Wachstumsraten.

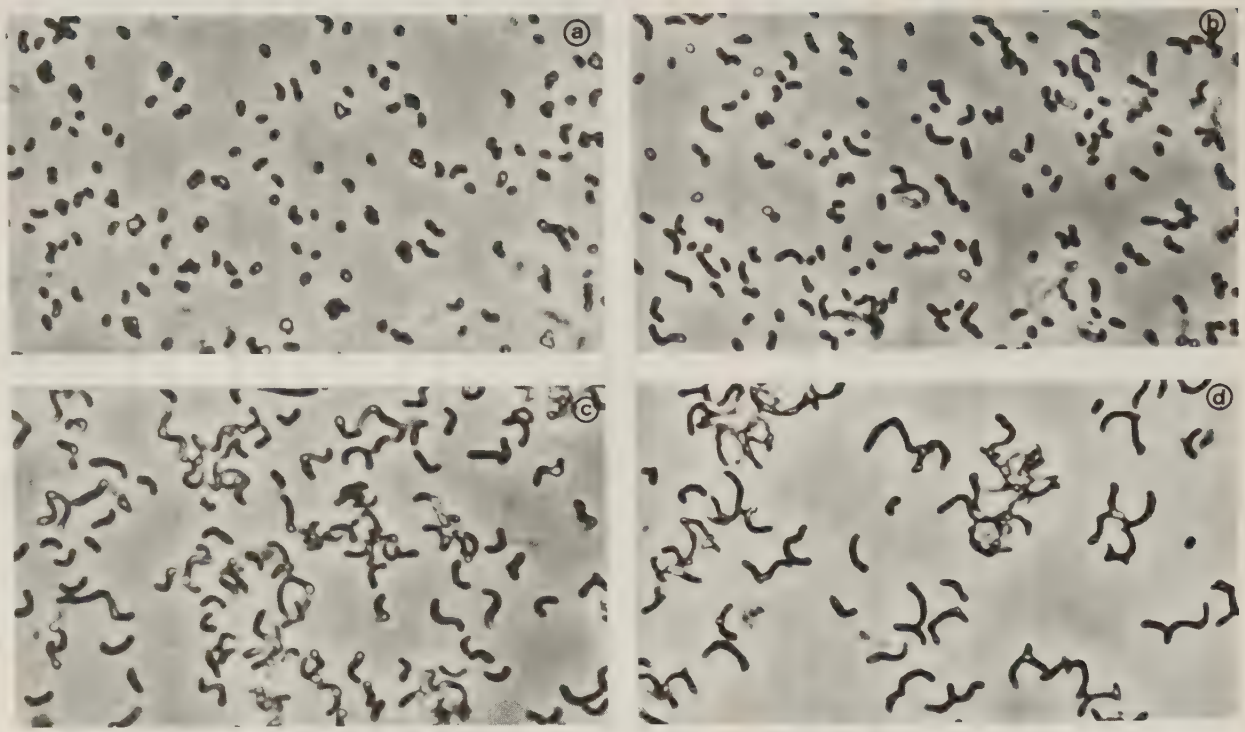


Abb. 30 a bis d: Änderung der Zellmorphologie in Abhängigkeit von der Wachstumsrate.
a) μ=0,04 (h^{-1}); b) μ=0,1 (h^{-1}); c) μ=0,16 (h^{-1}); d) μ=0,2 (h^{-1}).
(4800fache Vergrößerung)

IV. DISKUSSION

Wie eine Reihe von Untersuchungen zeigte, ist *R.erythropolis* in der Lage, auf verschiedenen monomeren Ligninbausteinen als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle zu wachsen. Auch 3,4-Dimethoxybenzoesäure und 4-Methoxybenzoesäure, die wie die Phenylpropaneinheiten im Lignin in 4-Stellung des aromatischen Rings eine Ätherbindung haben, werden sehr gut metabolisiert.

Dagegen konnte eine Spaltung von Diaryl- oder Aryl-Glyceryl-Äther Bindungen, wie Fukuzumi et al.(1969) bei Pilzen und Crawford et al.(1973 b), Crawford (1975 b) oder Fukuzumi und Katayama (1977) bei Bakterien beschrieben, anhand der getesteten Substrate bei *R.erythropolis* nicht nachgewiesen werden.

Während Ohta et al. (1979) bei *Fusarium solani* die Spaltung des Phenylcumaranrings in Dehydrodiconiferylalkohol nach Umwandlung des Cumaranrings zu Cumaron beschrieben, wurde bei *R.erythropolis* auch beim Wachstum mit Cumaran oder Cumaron in Anwesenheit eines Cosubstrats keine Veränderung dieser Ringstrukturen beobachtet.
Der untersuchte Stamm kann aber in Anwesenheit von Glucose oder 4-Hydroxybenzoesäure als Wachstumssubstrat das Dimer Dehydrodivanillin, das eine wichtige Struktureinheit des Ligninmoleküls repräsentiert, umwandeln.

Versuche zum Abbau verschiedener Dimerstrukturen mit Bakterien der Gattungen *Arthrobacter, Brevibacterium, Corynebacterium, Nocardia* und *Rhodococcus* zeigten, daß auch diese Organismen ein Cosubstrat benötigen. Vermutlich ist eine leicht verwertbare Kohlenstoffquelle zur Energieversorgung und zur Bereitstellung wichtiger Intermediärprodukte notwendig.

Wie verschiedene Analysen der in der Kultur mit Dehydrodivanillin neuentstandenen Substanz ergaben, werden wahrschein-

lich die Methoxylgruppen des aromatischen Rings abgespalten, während die Biphenyl-Struktur erhalten bleibt.
Ähnliche Untersuchungen mit *Pseudomonas ovalis* zeigten, daß dieser Stamm Dehydrodivanillin nicht angreifen kann , obwohl er verschiedene Ätherbindungen in Ligninmodellsubstanzen spaltet (Kawakami, 1975 b).

Beim Wachstum von *R. erythropolis* auf Coniferylalkohol wurde beobachtet, daß der Alkohol zunächst fast quantitativ zu Coniferylaldehyd oxidiert wurde, der sich im Medium anreicherte und erst nach einer längeren lag-Phase abgebaut wurde. Im Rohextrakt dieser Zellen wurde eine NAD^+-abhängige Coniferylalkohol-Dehydrogenase gemessen, die über verschiedene chromatographische Methoden ca. 1200fach angereichert werden konnte.

Substratspezifitätstests ergaben, daß das Enzym keine aliphatischen Alkohole oxidiert. Von den getesteten aromatischen Alkoholen werden außer Coniferylalkohol mit geringerer Spezifität auch Zimtalkohol und Vanillylalkohol umgesetzt.
Während für Vanillylalkohol ein ähnlich niedriger K_M-Wert wie für Coniferylalkohol gefunden wird, beträgt die relative Aktivität für Vanillylalkohol ca. 15 %. Bei Zimtalkohol ist dieses Verhältnis genau umgekehrt; der K_M-Wert ist etwa 10fach höher als für Coniferylalkohol, die relative Aktivität beträgt jedoch 35 %.
Dies könnte bedeuten, daß die Affinität der Substrate zum Enzym von der Substituentenanordnung am aromatischen Ring abhängig ist, während die Umsatzrate von der propanoiden Seitenkette bestimmt wird.

Interessanterweise oxidiert die gefundene Coniferylakohol-Dehydrogenase auch die Dimere Dehydrodiconiferylalkohol und Guaiacylglycerol- β -Coniferyläther sowie ein Dehydrierungspolymerisat von Coniferylalkohol (DHP).

Coniferylalkohol-Dehydrogenasen wurden auch in der Kambialregion höherer Pflanzen nachgewiesen (Mansell et al., 1974, 1976),dort aber im Zusammenhang mit der Ligninbiosynthese diskutiert.
So konnten Wyrambik und Grisebach (1975, 1979) eine Zimtalkohol-Dehydrogenase aus Sojabohnen isolieren, die bevorzugt Zimtaldehyd zu Zimtalkohol reduziert, der ein direkter Precursor der Ligninbiosynthese ist. Entsprechend den Biosynthesevorgängen benötigen alle Zimtalkohol-Dehydrogenasen phosphoryliertes Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (NADP(H)) als Coenzym.
Die Affinität der Coniferylalkohol-Dehydrogenase aus *R.erythropolis* zu $NADP^+$ ist jedoch wesentlich geringer als zu NAD^+,was durch einen ca. 63fach kleineren K_M-Wert für NAD^+ charakterisiert wird.

Auch die aromatischen Alkoholdehydrogenasen aus *Pseudomonas spec.* und *Pseudomonas putida* benötigen NAD^+ als Coenzym, unterscheiden sich aber von der Coniferylalkohol-Dehydrogenase aus *R.erythropolis* durch das Substratspektrum (Tab. 15) (Katagiri et al., 1977, Keat und Hopper, 1978).

	Pseudomonas spec.;*Pseudomonas putida*;*R.erythropolis* (Katagiri et al.'67)(Keat, Hopper '78)		
Zimtalkohol und Derivate	n. b.	n. b.	+
Benzylalkohol und Derivate	+	+	Vanillylalkohol
aliphatische Alkohole	+ mit höhermolekularen Alk.	-	-
Coenzym	NAD(H)	NAD(H)	NAD(H)
Molekulargewicht	n. b.	Isoenzym 1 145.000 Isoenzym 2 122.000 Isoenzym 3 75.000	200.000

Tab. 15: Vergleich der Eigenschaften aromatischer Alkoholdehydrogenasen aus Bakterien

n. b. = nicht bestimmt

Ein Enzym, das ähnlich wie die Dehydrogenase aus *R.erythropolis* mono-, di- und oligomere Zimtalkohole oxidiert wurde kürzlich beim Wachstum von *Fusarium solani* auf Dehydrodiconiferylalkohol und Guaiacylglycerol- β-Coniferyläther beschrieben. Es handelt sich jedoch um eine extrazelluläre, konstitutive Oxidase (Iwahara et al., 1980).
Auch bei dem Weißfäulepilz *Polystictus versicolor* beschrieben Farmer et al. (1960) und Russel et al. (1961) eine konstitutive extrazelluläre Oxidase, die eine Reihe primärer aromatischer Alkohole oxidiert.

Die Oxidation der alkoholischen Gruppen scheint beim Abbau von Lignin und Ligninmodellsubstanzen eine wichtige Initialreaktion zu sein (Ohta et al., 1979; Katayama et al., 1980). So fanden auch Hata (1966) und Chang et al. (1980), daß bei der Oxidation der Coniferylalkohol-Seitenkette im Lignin durch Weißfäulepilze Vanillinsäuregruppen entstehen, die nachfolgend als monomere oder oligomere Säuren und Phenole freigesetzt werden können.

Obwohl die gefundene Coniferylalkohol-Dehydrogenase von *R.erythropolis* auch Dimere des Coniferylakohols und DHP oxidiert, ist es nicht sicher, ob dieses Enzym wie die extrazelluläre Oxidase bei *Fusarium solani* in vivo eine Rolle beim Ligninabbau spielt.
Kleinere Moleküle,wie die erwähnten Dilignole,könnten zwar von der Zelle aufgenommen und intrazellulär abgebaut werden, es ist jedoch unklar, wie eine NAD^+-abhängige Dehydrogenase in vivo ein Polymer oxidieren kann, da Polymere entweder extrazellulär oder in engem Kontakt zur Zellwand abgebaut werden müßten. Denkbar wäre, daß das Enzym zellwandgebunden ist und die Oxidation in enger Verbindung mit dem Substrat stattfindet.
Ein enger Kontakt zwischen dem Substrat und den Organismen wurde beim Abbau von Lignocellulose durch Pilze beschrieben (Kirk et al., 1978 b; Santo und Sahm,1978).

Ferner könnte aber auch ein großes Oberflächen-Volumen Verhältnis, wie es bei *R.erythropolis* in kontinuierlicher Kultur bei niedriger Wachstumsrate beobachtet wurde, einen größeren Kontakt zum Substrat ermöglichen und so beim Abbau großer, wasserunlöslicher Moleküle, wie Lignin, von Vorteil sein.
Untersuchungen zur Lokalisation der Coniferylalkohol-Dehydrogenase in *R.erythropolis* könnten weiteren Aufschluß über die Beteiligung des Enzyms am Ligninabbau geben.

Untersuchungen zum Abbauweg niedermolekularer Aromaten haben gezeigt, daß die getesteten Substrate entweder über den β-Ketoadipat-Weg oder über den Gentisat-Weg metabolisiert werden.
Welcher der beiden Wege benutzt wird, ist abhängig vom Wachstumssubstrat.
So wird 3-Hydroxybenzoesäure in 6-Stellung zu Gentisinsäure und nicht, wie z. B. bei *Pseudomonas testosteroni* (Wheelis et al., 1967) in 4-Stellung, hydroxyliert.

In den meisten Fällen werden die Substrate jedoch zu den o-Diphenolen Protocatechusäure oder Catechol oxidiert.
Während Feist und Hegemann (1969) beschrieben, daß *Pseudomonas putida* Catechol intradiol spaltet, wenn der Organismus auf Benzoesäure wächst, beim Wachstum auf Phenol aber ein extradiolspaltendes Enzym induziert wird, werden beide Substrate bei *R.erythropolis* über den β-Ketoadipat-Weg abgebaut.
Auch für Protocatechusäure wurde im Gegensatz zu dem nahe verwandten *Nocardia asteroides* Stamm (43003) kein extradiolspaltendes Enzym gefunden. Erstaunlicherweise benutzt *Nocardia asteroides* beim Wachstum auf 4-Hydroxybenzoesäure zur Spaltung von Protocatechusäure eine meta-Dioxygenase (eigener Befund, unveröffentlicht).
In *R.erythropolis* scheint der β-Ketoadipat-Weg also eine wichtige Rolle beim Aromatenabbau zu spielen.

Bezüglich der Regulation der Enzyme des β-Ketoadipat-Wegs zeigt *R.erythropolis* große Ähnlichkeit mit dem von Rann und Cain (1969) beschriebenen *Nocardia opaca* Stamm.
Das Induktionsschema dieses Organismus' und diejenigen von *Pseudomonas putida* (Ornston, 1966), *Acinetobacter calcoaceticus* (Cánovas und Stanier, 1967) und *Alcaligenes euthrophus* (Johnson und Stanier, 1971) sind in Abb. 31 gegenübergestellt.
Dabei fällt auf, daß die Protocatechuat-3,4-Dioxygenase bei den meisten Organismen durch das Substrat oder ein Substratanalogon induziert wird. Dies konnte bei *R.erythropolis* mit Hilfe einer Catechol$^{\ominus}$- und einer β-Ketoadipat$^{\oplus}$-Mutante ausgeschlossen werden. Sehr wahrscheinlich ist, wie für *Nocardia opaca* (Rann und Cain, 1969) nachgewiesen, auch in *R.erythropolis* die β-Ketoadipinsäure der Induktor.
Das erklärt auch die Induktion des Enzyms beim Wachstum auf allen Aromaten, die über den β-Ketoadipat-Weg metabolisiert werden.
Im Gegensatz zu dem erwähnten *Nocardia* Stamm bewirken jedoch strukturanaloge Substanzen, wie z. B. Adipinsäure, bei *R.erythropolis* keine Induktion der Protocatechuat-3,4-Dioxygenase.

Die Catechol-1,2-Dioxygenase wird vermutlich bei *R.erythropolis* wie bei *Nocardia opaca*, *Pseudomonas putida* und *Acinetobacter calcoaceticus* durch die cis-cis-Muconsäure induziert. Eine Substratinduktion wurde bisher nur bei *Alcaligenes euthrophus* und verschiedenen Pilzen beschrieben.
Auffallend ist, daß beim Wachstum auf Substraten, die über den Protocatechusäure-Zweig abgebaut werden, eine höhere Grundaktivität der Catechol-1,2-Dioxygenase zu finden ist, als beim Wachstum auf Glucose oder Substraten, die über Gentisinsäure abgebaut werden.
Dies wurde auch bei anderen nocardioformen Bakterien und *Pseudomonas putida* (Ornston, 1966) beschrieben, es konnte jedoch bisher keine Erklärung für diese Quervernetzung der beiden Zweige gegeben werden.

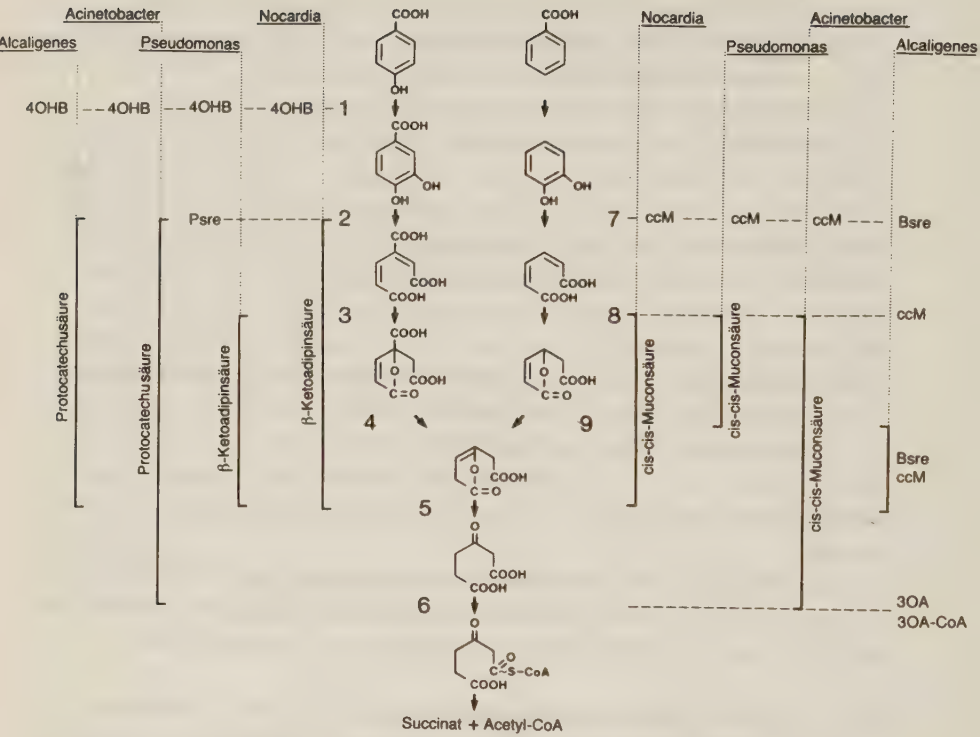


Abb. 31: Induktionsmechanismen des β-Ketoadipat-Wegs bei *Nocardia opaca*, *Pseudomonas putida*, *Acinetobacter calcoaceticus* und *Alcaligenes eutrophus*. Die einzelnen Schritte werden durch folgende Enzyme katalysiert: 1) 4-Hydroxybenzoesäure-3-Monooxygenase, 2) Protocatechuat-3,4-Dioxygenase, 3) β-Carboxy-cis-cis-Muconsäure-Cycloisomerase, 4) β-Carboxymuconolacton-Decarboxylase, 5) β-Ketoadipat-Enollacton-Hydrolase, 6) β-Ketoadipat-Succinyl-CoA-Transferase, 7) Catechol-1,2-Dioxygenase, 8) cis-cis-Muconsäure-Cycloisomerase, 9) Muconolacton-Isomerase.
Die Klammern zeigen koordiniert induzierte Enzymblöcke an
Die Abkürzungen bedeuten 4OHB = 4-Hydroxybenzoesäure, ccM = cis-cis-Muconsäure, Bsre = Benzoesäure, 3OA = β-Ketoadipinsäure und 3OA-CoA = β-Ketoadipyl-CoA

Da bei einer Anhäufung von β-Carboxy-cis-cis-Muconsäure in *R.erythropolis* die Catechol-1,2-Dioxygenase gebildet wird, bewirkt wahrscheinlich diese, analog zum eigentlichen Induktor, cis-cis-Muconsäure, die Synthese des Enzyms.
Beim Wildtyp, wird β-Carboxy-cis-cis-Muconsäure nicht angehäuft. Die intrazelluläre Konzentration bewirkt aber vermutlich die geringe Induktion der Protocatechuat-3,4-Dioxygenase.

Die extrazellulär angereicherte β-Carboxy-cis-cis-Muconsäure kann die Mutante nicht weiter abbauen.
Pseudomonas acidovorans und *Pseudomonas testosteroni* können dagegen β-Carboxy-cis-cis-Muconsäure verwerten, obwohl sie Aromaten nicht über den β-Ketoadipat-Weg oxidieren (Robert-Gero et al., 1969; Ornston und Ornston, 1972).
Ähnliche Beobachtungen machten auch Meagher et al. (1972) bei einer Mutante von *Pseudomonas putida* die beim Abbau von 4-Hydroxybenzoesäure intrazellulär entstandene β-Carboxy-cis-cis-Muconsäure nicht weiter metabolisiert, extrazelluläre angebotene β-Carboxy-cis-cis-Muconsäure aber abbaut.

Es wurde daher bei den erwähnten Organismen eine zweite Abbausequenz für β-Carboxy-cis-cis-Muconsäure neben dem β-Ketoadipat-Weg postuliert.
Bei *R.erythropolis* gibt es keine Anhaltspunkte für einen zusätzlichen Oxidationsweg für dieses Intermediärprodukt.

Experimente mit *R.erythropolis* zur Verwertung von Mischsubstraten haben gezeigt, daß Ferulasäure und 4-Hydroxybenzoesäure nicht sequentiell, sondern gleichzeitig oxidiert werden.
Obwohl für den Abbau der Ferulasäure im Vergleich zu 4-Hydroxybenzoesäure zusätzliche Enzyme induziert werden müssen, die die Abspaltung des Acetylrestes aus der Seitenkette, die Demethoxylierung und die Oxidation des Formaldehyds katalysieren, wird

der Abbau der Ferulasäure auch bei hohen Wachstumsraten nicht reprimiert.
Demgegenüber beschrieben Higgins und Mandelstam (1972), daß *Pseudomonas putida* in einem Substratgemisch von Mandelsäure und 4-Hydroxybenzoesäure letztere zuerst metabolisiert, obwohl Mandelsäure alleine sogar schneller verwertet wird als 4-Hydroxybenzoesäure.
Ebenso verwertet *Pseudomonas acidovorans* Catechol vor Vanillinsäure, da beim Abbau der Vanillinsäure zusätzlich Enzyme zur Entgiftung des Formaldehyds notwendig werden (Reber, 1973).

Auch Glucose bewirkt bei vielen Organismen die sequentielle Verwertung zweier Substrate (Stanier et al., 1970). Dies wurde beim Wachstum von *R.erythropolis* auf Ferulasäure plus Glucose nicht beobachtet.
Die gemeinsame Verwertung eines Kohlenhydrats und eines Aromaten hat für *R.erythropolis* eher einen fördernden Einfluß, insofern, als im Gemisch eine signifikant höhere Wachstumsrate erreicht wird, als auf den jeweiligen Substraten alleine.

Im Bereich hoher Verdünnungsraten werden die beiden Kohlenstoffquellen, Ferulasäure und Glucose, jedoch nicht mehr zu gleichen Anteilen verwertet, was auf eine Limitation durch die Ferulasäure abbauenden Enzyme hinweist.
Die beobachtete erhöhte Wachstumsrate in der Kultur mit Glucose und Ferulasäure gegenüber den Kulturen mit einem Substrat spricht für eine gegenseitige Ergänzung des Zellstoffwechsels durch die Substratkombination. Es könnte eine Aufgabenteilung zwischen Ferulasäure und Glucose bei diesem Substratgemisch bestehen, derart, daß Glucose leichter für den Energiestoffwechsel und Ferulasäure vorwiegend für den Baustoffwechsel benutzt wird.
Für diese Annahme spricht auch die spezifische Substratumsatzrate der Glucose. Glucose wird mit steigender Verdünnungsrate verstärkt oxidiert, führt aber nicht zu einer entsprechenden Zellmassenbildung.

Eine Bestätigung dieser Vermutung könnten Versuche mit ^{14}C-markierten Substanzen geben. Dabei müßte das Kohlenstoffisotop der Glucose vornehmlich in $^{14}CO_2$ nachzuweisen sein, während ringmarkierte Ferulasäure im Zellmaterial eingebaut würde.

Da *R.erythropolis* im Gegensatz zu den Weißfäulepilzen keine Cellulose und Hemicellulose verwertet, könnte der Organismus geeignet sein, aus der pflanzlichen Biomasse selektiv das Lignin abzubauen.
Auch zusammen mit anderen Ligninverwertern könnte *R.erythropolis* eingesetzt werden, um die beim Ligninabbau häufig entstehenden toxischen, niedermolekularen Substanzen, Guaiacol oder Catechol (Crawford 1975 b; Haars und Hüttermann, 1980), zu oxidieren.

V. ZUSAMMENFASSUNG

1. Wachstumsversuche mit *R.erythropolis* ergaben, daß der Stamm sehr gut auf einem Mineralsalzmedium mit verschiedenen monomeren Aromaten, die als Bausteine im Ligninmolekül vorkommen, wachsen kann.
Der Organismus ist jedoch nicht in der Lage, die Kohlenhydrate der pflanzlichen Biomasse, wie Cellulose, Cellobiose, Xylan oder Xylose zu verwerten.

2. Verschiedene höhermolekulare Aromaten mit ligninähnlichen, intermonomeren Bindungstypen wurden mit Ausnahme von Dehydrodivanillin nicht verwertet.
Dehydrodivanillin wurde in Anwesenheit von Glucose oder 4-Hydroxybenzoesäure teilweise oxidiert. Analysen der neuentstandenen Substanz führten zu der Annahme, daß die Methoxylgruppen der aromatischen Ringe abgespalten wurden.

3. Im Rohextrakt von Zellen, die auf Coniferylalkohol, Ferulasäure oder Vanillinsäure gewachsen waren, wurde eine NAD^+-abhängige Coniferylalkohol-Dehydrogenase mit einer spezifischen Aktivität von 0,54 U/mg gefunden.
Das Enzym konnte durch verschiedene chromatographische Methoden ca. 1200fach angereichert werden.
In Gegenwart des Coenzyms NAD^+ wurden Substrate mit α,β-ungesättigter Propenylseitenkette, wie Coniferylalkohol und Zimtalkohol sowie zu einem geringen Prozentsatz bezogen auf Coniferylalkohol auch Vanillylalkohol oxidiert. Interessanterweise wurden auch die Dimere des Coniferylalkohols, Dehydrodiconiferylalkohol und Guaiacylglycerol-β-Coniferyläther, sowie ein Polymerisationspräparat (DHP) umgesetzt.

4. Die meisten getesteten Aromaten wurden zu Protocatechusäure oder Catechol oxidiert und anschließend durch Intradiolspaltung über den β-Ketoadipat-Weg metabolisiert.

Extradiolspaltende Enzyme, wie Catechol-2,3-Dioxygenase, Protocatechuat-2,3-Dioxygenase und Protocatechuat-4,5-Dioxygenase wurden bei *R.erythropolis* nicht nachgewiesen. Neben dem β-Ketoadipat-Weg existiert in *R.erythropolis* auch der Gentisat-Weg, über den Gentisinsäure und 3-Hydroxybenzoesäure abgebaut wurden.

5. Mit Hilfe verschiedener Mutanten konnte gezeigt werden, daß die Protocatechuat-3,4-Dioxygenase durch β-Ketoadipinsäure induziert wird und daher auch während des Wachstums auf Precursorn des Catechol-Zweigs gebildet wird.
Die Catechol-1,2-Dioxygenase wird vermutlich durch cis-cis-Muconsäure induziert, da auch die strukturanaloge β-Carboxy-cis-cis-Muconsäure eine ähnliche Induktionswirkung auf das Schlüsselenzym des Catechol-Zweigs besitzt. Dies wurde anhand einer β-Carboxy-cis-cis-Muconsäure-Cycloisomerase defekten Mutante gezeigt, die beim Wachstum auf Glucose und Protocatechusäure β-Carboxy-cis-cis-Muconsäure anreichert, was zu einer Induktion der Catechol-1,2-Dioxygenase führt. Somit kann auch die 4 bis 5fach höhere Aktivität der Catechol-1,2-Dioxygenase beim Wachstum auf Precursorn des Protocatechusäure-Zweigs gegenüber der Grundaktivität erklärt werden.

6. Beim Wachstum auf Mischsubstraten in kontinuierlicher Kultur wurde weder mit dem Substratgemisch 4-Hydroxybenzoesäure und Ferulasäure noch mit Ferulasäure und Glucose eine Katabolitrepression beobachtet. In Kombination mit Glucose wurde sogar eine höhere maximale Wachstumsrate erreicht als auf den jeweiligen Substraten alleine.
Die spezifische Enzymaktivität der ringspaltenden Schlüsselenzyme des β-Ketoadipat-Wegs wurde beim Wachstum auf dem Aromatengemisch nicht beeinflußt. Dagegen war in der Kultur mit Ferulasäure und Glucose bei niedrigen Wachstumsraten eine hohe Catechol-1,2-Dioxygenase Aktivität feststellbar, die den Werten beim Wachstum auf Precursorn des Catechol-Zweigs entsprach. Dies ist vermutlich auf eine regulatorische Beeinflussung des Protocatechusäure-Zweigs zurückzuführen.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

Ahlquist, E. F. (1977):
The Regulation of Uptake and Catabolism and of Aromatic Compounds by Aspergillus niger. Ph. D. Thesis, University of Kent at Canterbury

Ander, P. und Eriksson, K. E. (1976):
The Importance of Phenol Oxidase Activity in Lignin Degradation by the White-Rot Fungus Sporotrichum pulverulentum. Arch. Microbiol. 109, 1-8

Ander, P. und Eriksson, K. E. (1978):
Lignin Degradation and Utilization by Microorganisms. In: Progress in Industrial Microbiology, 14, 1-59

Bavendamm, W. (1928):
Über das Vorkommen und den Nachweis von Oxidasen bei holzzerstörenden Pilzen. Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz, 38, 257-276

Beechy, D. E. und Ribbons, D. W. (1972):
Oxygen electrode measurements. In: Methods in Microbiology, Eds: I. R. Norris und D. W. Ribbons, Academic Press London, New York 6 B, 26-53

Bensadoun, A. und Weinstein, D. (1976):
Assay of Proteins in the Presence of Interfering Materials. Analytical Biochem. 70, 241-250

Bergmeyer, H. U. (1974):
Methoden der enzymatischen Analyse. Verl. Chem., Weinheim Bd. 1. Aufl. 3

Bernhard, F. H., Staudinger, H. und Ulrich, V. (1970):
Eigenschaften einer p-Anisat-O-Demethylase im zellfreien Extrakt von Pseudomonas species. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 351, 467-478

Björkman, A. (1956):
Studies on Finely divided Wood. I. Extraction of Lignin with Neutral Solvents. Sventsk Papperstidn. 59, 477-485

Bradford, M. M. (1976):
A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. Anal. Biochem. 72, 248-254

Briggs, G. E. und Haldane, J. B. S. (1925):
A Note on the Kinetics of Enzyme Action. Biochem. J. 19, 338-339

Cánovas, J. L. und Stanier, R. Y. (1967):
Regulation of the Enzymes of the β-Ketoadipate Pathway in Moraxella calcoacetica. Europ. J. Biochem. 1, 289-300

Cain, R. B., Bilton, R. F. und Darrah, J. A. (1968):
The Metabolism of Aromatic Acids in Microorganisms: Metabolic Pathways in the Fungi. Biochem. J. 108, 797-805

Cain, R. B. (1979):
Product-induction by 3-oxoadipate as a feature of the regulation of aromatic catabolism in actinomycetes. International Symposium on Actinomycete Biology, Köln

Cain, R. B. (1980):
The Uptake and Catabolism of Lignin-Related Aromatic Compounds and their Regulation in Microorganisms. In: Lignin Biodegradation: Microbiology , Chemistry and Potential Applications Eds.: T. K. Kirk, T. Higuchi, H. Chang CRC Press Florida 1, 21-60

Cartwright, N. J. und Holdom, K. S. (1973):
Enzymic Lignin, its Release and Utilization by Bacteria. Microbios. 8, 7-14

Chang, H. M., Chen, C. L. und Kirk, T. K. (1980):
The Cemistry of Lignin Degradation by White-Rot Fungi. In: Lignin Biodegradation: Microbiology, Chemistry and Potential Applications Eds: T. K. Kirk, T. Higuchi, H. M. Chang CRC Press Florida 1, 215-230

Chapman, P. J. (1972):
An Outline of Reaction Sequences used for Bacterial Degradation of Phenolic Compounds. In: Degradation of Synthetic Organic Molecules in the Biosphere, Ed. Dagley, S., National Academy of Sciences, Washington,17-55

Cook, K. A. und Cain, R. B. (1974):
Regulation of Aromatic Metabolism in the Fungi; Metabolic Control of the 3-Oxoadipate Pathway in the Yeast Rhodotorula mucilaginosa. J. Gen. Microbiol. 85, 37-50

Crawford, R. L. McCoy, E., Harkin, J. M., Kirk, T. K. und Obst, J. R. (1973 a):
Degradation of Methoxylated Benzoic Acids by a Nocardia from a Lignin-Rich Environment: Significance to Lignin Degradation and Effect of Chloro Substituents. Appl. Microbiol. 26, 176-184

Crawford, R. L., Kirk, T. K., Harkin, J. M. und McCoy, E. (1973 b):
Bacterial Cleavage of an Arylglycerol-β-Aryl Ether Bond. Appl. Microbiol. 25, 322-324

Crawford, R. L. (1975 a):
Novel Pathway for Degradation of Protocatechuic Acid in Bacillus Species. J. Bacteriol. 121, 531-536

Crawford, R. L. (1975 b):
Mutualistic degradation of the lignin model compound veratrylglycerol-β-(o-methoxyphenyl)-ether by bacteria. Can. J. Microbiol., 21, 1654-1657

Crawford, D. L. und Crawford, R. L. (1980):
Microbial degradation of lignin. Enzyme Microb. Technol., 2, 11-22

Crawford. D. L. und Sutherland J. B. (1980):
Isolation and Charakterisation of Lignocellulose-Decomposing Actinomycetes. In: Lignin Biodegradation: Microbiology, Chemistry and Potential Applications. Eds.: T. K. Kirk, T. Higuchi, H. Chan CRC Press Florida 1, 95-101

Dagley, S. (1971):
Catabolism of Aromatic Compounds by Micro-Organisms. Adv. Microb. Physiol. 6, 1-46

Dagley, S. (1978):
Microbial Catabolism, the Carbon Cycle and Environmental Pollution. Naturwissenschaften 65, 85-95

Deschamps, A. M., Mahoudeau, G. und Lebeault, J. M. (1980):
Fast Degradation of Kraft Lignin by Bacteria. Europ. J. Appl. Microbiol. Biotechn. 9, 45-51

Eggeling, L und Sahm, H. (1978):
Degradation of Phenols and of the Lignin Model Compound DHP by a Mutant of Nocardia spec. Abstracts of the XII International Congress of Microbiology München, 157

Eggeling, L. und Sahm, H. (1980):
Degradation of Coniferyl Alcohol and other Lignin Related Aromatic Compounds by Nocardia sp. DSM 1069. Arch. Microbiol. 126, 141-148

Enoki, A., Goldsby, G., Gold, M. H. (1980):
Metabolism of Lignin Model Compounds Veratrylglycerol-β--guaiacyl Ether and 4-Ethoxy-3-methoxyphenylglycerol-β guaiacyl Ether by Phanerochaete chrysosporium. Arch. Microbiol.125, 227-232

Eriksson, K-E. und Lindholm U. (1971):
Ligninets mikrobiella nedbrytning. Svensk Paperstidn. 74, 701-706

Eriksson, K.E. (1980):
Degradation of lignocellulosic materials by the white-rot fungus Sporotrichum pulverulentum. In:Proceedings of the Cost-Workshop on the Production and Feeding of Single Cell Protein. Kernforschungsanlage Jülich GmbH (1980) 48-63

Farmer, V. C., Henderson, E. K. und Russell, J. D. (1960):
Aromatic-Alcohol-Oxidase Activity in the Growth Medium of Polystictus versicolor. Biochem. 74, 257-262

Feist, C. F. und Hegemann, G. D. (1969):
Phenol and Benzoate Metabolism by Pseudomonas putida: Regulation of Tangential Pathways. J. Bacteriol 100, 869-877

Flaig, W. und Haider, K. (1961):
Die Verwertung phenolischer Verbindungen durch Weißfäulepilze. Arch. Mikrobiol. 40, 212-223

Freudenberg, K., Reznik, H., Boesenberg , H. und Radenack, D. (1958):
Das an der Verholzung beteiligte Fermentsystem. Chem. Ber. 85, 641

Freudenberg, K. und Neish, A. C. (1968):
Constitution and Biosynthesis of Lignin. Springer-Verlag, Berlin,

Fujisawa, H. und Hayaishi, O. (1968):
Protocatechuate-3,4-Dioxygenase I. Crystallization and Characterization. J. Biol. Chem. 243, 2673-2681

Fukuzumi, T., Takatuka, H. und Minami, K. (1969):
Enzymatic Degradation of Lignin V: The Effect of NADH on the Enzymatic Cleavage of Arylalkylether Bond in Veratrylglycerol-β-guaiacylether as Lignin Model Compound. Arch. Biochem. Biophys. 129, 396-409

Fukuzumi, T und Katayama, Y. (1977):
Bacterial Degradation of Dimer Relating to Structure of Lignin. I.β-Hydroxypropiovanillone and coniferyl-alcohol as initial degradation products from guaiacyl-glycerol-β-coniferylether by Pseudomonas putida. J. Jap. Wood Res. Soc., 23, 214-215

Gadd, O. (1957):
Wood Decay Resulting from Rot Fungi. Paper and Timber 8, 363-374

Grabbe, K., Koenig, R. und Haider, K. (1968):
Die Bildung der Phenoloxydase und die Stoffwechselbeeinflussung durch Phenole bei Polystictus versicolor. Arch. Microbiol. 63, 133-153

Gradziel, K., Haider, K., Kochmanska, J., Malarczyk, E. und Trojanowski, J. (1978):
Bacterial Decomposition of Synthetic ^{14}C-labeled Lignin and Lignin Monomer Derivatives. Acta Microbiol. Pol. 27, 103-109

Haars, A. und Hüttermann, A. (1980):
Function of Laccase in the White-Rot Fungus Fomes annosus. Arch. Microbiol. 125, 233-237

Haider, K., Lim, S. und Flaig, W. (1964)
Experimente und Theorien über den Ligninabbau bei der Weißfäule des Holzes und bei der Verrottung pflanzlicher Substanz im Boden. Holzforschung 18, 3, 81-88

Haider, K. (1965):
Untersuchungen über den mikrobiellen Abbau von Lignin. Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. 198, 305-316

Haider, K. und Grabbe, K. (1967):
Die Rolle der Phenoloxydase beim Ligninabbau durch Weißfäulepilze. Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. 205, 91-96

Haider K. und Trojanowski, J (1975):
Decomposition of Specifically ^{14}C-Labelled Phenols and Dehydropolymers of Coniferyl Alcohol as Models for Lignin Degradation by Soft and White Rot Fungi. Arch. Microbiol. 105, 33-41

Haider, K., Trojanowski,J. und Sundman, V. (1978):
Screening for Lignin Degrading Bacteria by Means of ^{14}C-Labelled Lignins. Arch. Microbiol. 119, 103-106

Hall, P. L. (1980):
Enzymatic tranformations of Lignin: 2. Enzyme Microb. Technol. 2, 170-176

Harkin, J. M. Und Obst, J. R. (1973):
Lignification in Trees: Indication of Exclusive Peroxidase Participation. Science 180, 296-298

Hata, K. (1966):
Investigations on Lignins and Lignifications. XXXIII. Studies on Lignins Isolated from Spruce Wood Decayed by Poria subacida B 11. Holzforschung 20, 142-147

Hegemann, G. D. (1966):
Synthesis of the Enzymes of the Mandelate Pathway by Pseudomonas putida. I. Synthesis of Enzymes by the Wild Type. J. Bacteriol. 91, 1140-1154

Herbert, D. (1961):
The Chemical Composition of Micro-Organisms as a Function of their Environment. In: Microbial Reaction to Environment Eds: G. G. Meynell und H. Gooder, 11th Symp. Soc. Gen. Microbiol. Cambridge, 391-416

Higgins, S. J. und Mandelstam, J. (1972):
Regulation of Pathways degrading Aromatic Substrates in Pseudomonas putida. Enzymatic Response to Binary Mixtures of Substrates.Biochem. J. 126, 901-916

Higuchi, T. (1980):
Biochemistry of Lignification. Wood Res. 66., 1-16

Hiroi, T. und Eriksson, K. E. (1976):
Microbial Degradation of Lignin. Part 1. Influence of cellulose on the degradation of lignins by the white-rot fungus Pleurotus ostreatus. Svensk Papperstidn. 79, 157-161

Hosokawa, K. und Stanier, R. Y. (1966):
Crystallization and Properties of p-Hydroxybenzoate Hydroxylase from Pseudomonas putida. J. Biol. Chem. 241, 10, 2453-2460

Huber, T. J., Street, J. R., Bull, A. T., Cook, K. A. und Cain, R. B. (1975):
Aromatic Metabolism in the Fungi. Growth of Rhodotorula mucilaginosa in p-Hydroxybenzoate-Limited Chemostats and the Effect of Growth Rate on the Synthesis of Enzymes of the 3-Oxoadipate Pathway. Arch. Microbiol. 102, 139-144

Ishihara, T. und Miyazaki, M (1974):
Demethylation of Lignin and Lignin Models by Fungal Laccase. J. Jap. Wood Res. Soc. 20, 39-41

Ishihara, T. (1980):
The Role of Laccase in Lignin Biodegradation. In: Lignin Biodegradation: Microbiology, Chemistry and Potential Applications Eds.: T. K. Kirk, T. Higuchi, H. Chang CRC Press Florida 2, 17-31

Iwahara, S., Nishihara, T., Jomori, T., Kuwahara, M. und Higuchi, T. (1980):
Enzymatic Oxidation of α,β-Unsaturated Alcohols in the Side Chain of Lignin-related Aromatic Compounds. J. Ferm. Technol. 58, 183-188

Jacobson, L. (1951):
Maintenance of Iron Supply in Nutrient Solutions by a Single Addition of Ferric Potassium Ethylendiamine Tetra-Acetate. Plant Physiol. 26, 411-413

Jaenicke, L. (1966):
Einführung in die Praxis des Biochemikers. Inst. für Biochem., Universität Köln

Jaschof, H. (1964):
Preliminary Studies of the Decomposition of Lignin by Bacteria Isolated from Lignite. Geochim. Cosmochim. Acta 28, 1623-1624

Johnson, B. F. und Stanier, R. Y. (1971):
Regulation of the β-Ketoadipate Pathway in Alcaligenes eutrophus. J. Bacterial. 107, 476-485

Karanth, N. G. K. und Reber, H. (1979):
Regulation of the Utilization of 4-Hydroxybenzoate and 4-Hydroxycinnamate in Batch and Continous Cultures of Pseudomonas testosteroni. Arch. Microbiol., 120 97-103

Katagiri, M., Takemori, S., Nakazawa, K., Suzuki, H. und Akagi, K. (1967):
Benzylalcohol Dehydrogenase, a New Alcohol Dehydrogenase from Pseudomonas sp. Biochem. Biophys. Acta 139, 173-176

Katayama, T., Nakatsubo, F. und Higuchi, T. (1980):
Initial Reactions in the Fungal Degradation of Guaiacylglycerol-β-Coniferyl Ether, a Lignin Substructure Model. Arch. Microbiol. 126, 127-132

Kawakami, H. (1975 a):
Bacterial Degradation of Lignin Model Compounds. I. On the Celeavage of Aromatic Nuclei. J. Jap. Wood Res. Soc. 21, 93-100

Kawakami, H. (1975 b):
Bacterial Degradation of Lignin Model Compound. II. On the Degradation of Model Dimers and 5-Position Condensed Type Compounds of Gauiacyl Nuclei. 21, 629-634

Keat, M. J. und Hopper, D. J. (1978):
The Aromatic Alkohol Dehydrogenases in Pseudomonas putida N. C. I. B. 9869 Grown on 3,5-Xylenol and p-Cresol. Biochem. J. 175, 659-667

Kilby, B. A. (1948):
The bacterial oxidation of phenol to β-Ketoadipic acid. Biochem. J., 43,

Kilby. B. A. (1951):
The formation of β-Ketoadipic acid by bacterial fission of aromatic rings. Biochem. J., 49, 671,674

Kirk, T. K. und Kelman, A. (1965):
Lignin Degradation as Related to the Phenoloxidases of Selected Wood-Decaying Basidiomycetes. Phytopathology 55, 739-745

Kirk, T. K., Harkin, J. M. und Cowling, E. B. (1968):
Degradation of the Lignin Model Compound Syringylglycerol β-Guaiacyl Ether by Polyporus versicolor and Stereum frustulatum. Biochem. Biophys. Acta 165, 145-163

Kirk, T. K. und Adler, E. (1969):
Catechol Moities in Enzymatically Liberated Lignin. Acta Chem. Scand. 23, 705-708

Kirk, T. K. und Adler, E. (1970):
Methoxyl-deficient structural elements in Lignin of sweetgum decayed by a brown-rot fungus. Acta Chem. Scand. 24. 3379-3390

Kirk, T. K. und Adler, E. (1971):
Effects of Microorganisms on Lignin. Ann. Rev. Phytopathology 9, 185-210

Kirk, T. K. (1975):
Effects of a Brown-Rot Fungus, Lenzites trabea, on Lignin in Spruce Wood. Holzforschung 29, 99-106

Kirk T. K. und Chang, H. (1975):
Decomposition of Lignin by White-rot Fungi II. Characterization of Heavily Degraded Lignins from Decayed Spruce. Holzforschung 28, 56-64

Kirk, T. k., Connors, W. J. und Zeikus, J. G. (1976):
Requirement for a Growth Substrate During Lignin Decomposition by Two Wood-Rotting Fungi. Appl.Environ. Microbiol. 32, 192-194

Kirk, T., Connors, W. J. und Zeikus, J. G. (1977):
Advances in Understanding the Microbiological Degradation of Lignin. In: Recent Advances in Phytochemistry. The Structure, Biosynthesis and Biodegradation of Wood. Eds.: F. A. Loewus, V. C. Runeckles, Plenum Press New York, 11, 369-394

Kirk, T. K., Yang, H.H. und Keyser, P. (1978 a):
The Chemistry and Physiology of the Fungal Degradation of Lignin. Dev. Ind. Microbiol. 19, 51-61

Kirk, T. K., Schulz, E., Connors, W. J. Lorenz, L. F. und Zeikus, J. G. (1978 b):
Influence of culture parameters on lignin metabilism by Phanerochaete chrysoporium Arch. Microbiol. 117, 277-285

Kuenen, J. G., Boonstra, J., Schröder, H. G. J. und Veldkamp, H. (1977):
Competition For Inorganic Substrate Among Chemoorganotrophic And Chemolithotrophic Bacteria. Microbial Ecology 3, 119-130

Luscombe, B. M. und Gray, T. R. G. (1971):
Effect of Varying Growth Rate on the Morphology of Arthrobacter. J. Gen. Microbiol. 69, 433-434

Mansell, R. L., Gross, G. G., Stöckigt, J., Franke, H. und Zenk, M. H. (1974):
Purification and Properties of Cinnamyl Alcohol Dehydrogenase from Higher Plants Involved in Lignin Biosynthesis. Phytochemistry 13, 2427-2435

Mansell, R. L., Babbel,G. R. und Zenk, M. H. (1976):
Multiple Forms and Specificity of Coniferyl Alcohol Dehydrogenase from Cambial Regions of Higher Plants. Phytochemistry, 15, 1849-1853

Matin, A. und Veldkamp, H. (1978):
Physiological Basis of the Selective Advantage of a Spirillium sp. in a Carbon-limited Environment. J. Gen. Microbiol. 105, 187-197

Maurer, H. R. (1971):
Disc Electrophoresis and Related Techniques of Polyacrylamide Gel Electrophoresis. Walter de Gruyter, Berlin, New York

Meagher, R. B., McCorkle, G. M., Ornston, M. K. und Ornston, L. N. (1972):
Inducible Uptake System for β-Carboxy-cis-cis-muconate in a Permeability Mutant of Pseudomonas putida. J. Bacteriol. 111, 2, 465-473

Nimz, H., Mogharab, L. und Lüdemann, H. D. (1974):
Vergleich von Fichtenlignin mit künstlichem Lignin nach Freudenberg . Makromol. Chem. 175, 2563-2576

Odier, E. und Monties, B. (1977):
Activité ligninolytique in vitro de Bactéries isolées de paille de Blé en décomposition. C. R. Acad. Sci. Paris, D. 284, 6, 2175-2178

Odier, E. und Monties, B. (1978):
Biodégradion de la lignine de Blé par Xanthomonas 23. Ann. Microbiol. 129 A, 361-377

Ohta, M., Higuchi, T. und Iwahara, S. (1979):
Microbial Degradation of Dehydrodiconiferyl Alcohol,a Lignin Substructure Model. Arch. Microbiol. 121, 23-38

Ono, K., Nozaki, M., und Hayaishi, O. (1970):
Purification and some Properties of Protocatechuate-4,5-Dioxygenase. Biochem. Biophys. Acta 220, 224-238

Ornston, L. N. (1966):
The Conversion of Catechol and Protocatechuate to β-Ketoadipate by Pseudomonas putida. IV. Regulation J. Biol. Chem. 241, 16, 3800-3810

Ornston, M. K. und Ornston, L. N. (1972):
The Regulation of the β-Ketoadipate Pathway in Pseudomonas acidovorans and Pseudomonas testosteroni. J. Gen. Microbiol. 73, 455-464

Pirt, S. J. (1975):
Principles of Microbe and Cell Cultivation. Blackwell Scient. Public Oxford

Randerath, K. (1962):
Dünnschicht-Chromatographie. Verl. Chemie Weinheim, 85-86

Rann, D. L. und Cain, R. B. (1969):
The Regulation of the Enzymes of Aromatic-Ring Fission in an Actinomycete. Biochem. J., 114, 77

Rann, D. L. und Cain, R. B. (1973):
Regulation of the Enzymes of Aromatic Ring Fission in the Genus Nocardia. Biochem. Soc. Transactions, 537th Meeting, Canterbury, 1, 658-661

Rast, H. G. Engelhardt, G., Ziegler, W. und Wallnöfer, P. R. (1980):
Bacterial Degradation of Model Compounds for Lignin and Chlorophenol Derived Lignin Bound Residues. FEMS Microbiol. Letters 8. 256-263

Reber, H. (1973):
Comparative Studies with Two Pseudomonads on the Sequential Degradation of Aromatic Substances Metabolized via Different Pathways. Arch. Microbiol. 89, 305-315

Reber, H. (1975):
Investigation of the Sequential Degradation of Aromatic-Substances in Pseudomonads. In: Biodégradation et humification, Eds.: G. Kilbertus, O. Reisinger, A. Mourrey, J. A. Cancela da Fonseca Sarreguémines, Pierron 466-469

Robert-Gero, M.,Poiret, M. und Stanier, R. Y. (1969):
The Function of the β-Ketoadipate Pathway in Pseudomonas acidovorans. J. Gen. Microbiol. 57, 207-214

Robinson, L. E. und Crawford, R. L. (1978):
Degradation of ^{14}C-Labeled Lignins by Bacillus Megaterium. FEMS Microbiol. Letters 4, 301-302

Rothera, A. C. H. (1908):
Note on the sodium nitro-prusside reaction for acetone. J. Physiol., 37, 491-494

Rösch, R. (1966):
Über die Funktion der Phenoloxidasen holzabbauender Pilze. In: Holz und Organismus, Eds.: G. Becker W.,Liese, Int. Symp. Berlin-Dahlem 1965, Berlin: Duncker und Humbold, 173-185

Russel, J. D., Hendersson, M. E. K. und Farmer, V. C. (1961):
Metabolism of Lignin Model Compounds by Polystictus versicolor. Biochem. Biophys. Acta 52, 565-570

Santo, L. und Sahm, H. (1978):
Single Cell Protein from Straw. Abstracts of the XII International Congress of Microbiology München, 156

Schaechter, M., Maaløe,O, und Kjeldgaard, N. O. (1958):
Dependency on Medium and Temperature of Cell Size and Chemical Composition during Balanced Growth of Salmonella typhimurium. J. Gen. Microbiol. 19, 592-606

Sistrom, W. R. und Stanier, R. Y. (1980):
The Mechanism of Formation of β-Ketoadipic Acid by Bacteria. J. Biol Chem. 120, 821-836

Skyring, G. W., Miller, R. W. und Purkayastha, V. (1970):
Improved Method for Characterization of Bacterial Dehydrogenases Using Acrylamide Gel Disc Electrophoresis.Analytical Bioch. 36, 511-520

Smith, R. V. und Davis, P. J. (1980):
Induction of Xenobiotic Monoxygenases. Adv. Biochem. Engin. 14, 61-100

Sörensen, H. (1962):
Decomposition of Lignin by Soil Bacteria and Complex Formation between Authoxidized Lignin and Organic Nitrogen Compounds. J . Gen. Microbiol. 27, 21-34

Sparnins,V. L. und Dagley, S. (1975):
Alternative Routes of Aromatic Catabolism in Pseudomonas acidovorans and Pseudomonas putida: Gallic Acid as a Substrate and Inhibitor of Dioxygenases. J. Bacteriol. 124, 3, 1374-1381

Stanier, R. Y. (1955):
Cleavage of Aromatic Rings with Eventual Formation of β-Ketoadipic Acid. In: Methods in Enzymolcgy, Eds. S. P. Colowick and N. O. Kaplan, Academic Press, New York, 2, 284-287

Stanier, R. Y, Doudoroff, M. und Adelberg, E. A. (1970):
Gram-positiv eubacteria not forming endospores.
in: General Microbiology Macmillan Press, London 654-685

Stanier, R. Y. und Ornston, L. N. (1973):
The β-Ketoadipate Pathway. Adv. Microb. Physiol. 9, 89-151

Sundman, V. Kuusi, T., Kuhanen, S., Kilpi, S. und Sederholm, H. (1968):
Observations on Bacterial Utilization of the Lignin from brown rotted spruce wood and Brauns' native lignin. Fin. Kemists. Medd. 77, 70-86

Sundman, V. und Näse, L. (1971)
A Simple Plate Test for Direct Visualization of Biological Lignin Degradation. Paper and Timber 2, 67-71

Thatcher, D. R. (1971):
The Enzymology of Aromatic Ring Fission in Fungi. Ph. D. thesis, University of Newcastle-upon-Tyne

Timell, T. E. und Syracuse, N. Y. (1967):
Recent Progress in the Chemistry of Wood Hemicelluloses. Wood Sci. Technol. 1,45 -70

Trojanowski, J., Haider, K. und Sundman, V. (1977):
Decomposition of ^{14}C-Labelled Lignin and Phenols by a Nocardia sp. Arch. Microbiol. 114, 149-153

Veldkamp, H. (1976):
Continuous Culture in Microbial Physiology and Ecology. Patterns of Progress, Durham: Medowfield Press,

Weissenböck, G. (1976):
Ligninbiosynthese und Lignifizierung pflanzlicher Zellwände.Biol. in unserer Zeit 5, 140-147

Webb, J. L. (1963):
Enzyme and Metabolic Inhibitors. Academic Press 1, 193-317

Wheelis, M. L., Palleroni, N. J. und Stanier, R. Y. (1967):
The Metabolism of Aromatic Acids by Pseudomonas testosteroni and Pseudomonas acidovorans. Arch. Microbiol. 59. 302-314

Wichmann, R. und Wandrey, C. (1980):
On-line Determination of Reaction Rate versus Substrate Concentration for an Enzymatically Catalysed Reaction by Means of a Microcomputer System. Enz. Eng. 5 (in Druck)

Wyrambik, D. und Grisebach, H. (1975):
Purification and Properties of Isoenzymes of Cinnamyl-Alkohol Dehydrogenase from Soybean-Cell Suspension Cultures. Eur. J. Biochem. 59, 9-15

Wyrambik, D. und Griesebach. H. (1979):
Enzymatic Synthesis of Lignin Precursors. Further Studies on Cinnamyl-Alcohol Dehydrogenase from Soybean-Cell-Suspension Cultures. Eur. J. Biochem. 97, 503-509

Lebenslauf

18.7.1952	geboren in Stolberg
1958 - 1963	Besuch der Grundschule in Stolberg-Münsterbusch
1963 - 1971	Besuch des Goethe-Gymnasiums in Stolberg und Abitur
1971 - 1977	Studium der Biologie an der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen
Mai 1974	Diplom-Biologen-Vorprüfung
September 1977	Diplom-Biologen-Hauptprüfung mit den Fächern: Mikrobiologie, Pflanzenphysiologie, Biochemie und Hygiene. Die Diplomarbeit wurde bei Herrn Prof. Dr. C. C. Emeis im Institut für angewandte Biologie der RWTH-Aachen angefertigt.
1977 - 1980	Arbeit an der vorliegenden Dissertation unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Sahm im Institut für Biotechnologie I der Kernforschungsanlage Jülich GmbH.